

Phänotypische und funktionale Charakterisierung Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen bei malignen Erkrankungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Carmen Choi
aus Daejon / Südkorea

Frankfurt 2004
DF1

Vom Fachbereich der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

.....

Datum der Disputation:

Phantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt.

Albert Einstein

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die T-Zell-vermittelte Immunität	1
1.1.1	Die Antigenerkennung	2
1.1.2	Die T-Zellaktivierung	3
1.1.3	Eigenschaften bewaffneter Effektor T-Zellen	4
1.1.4	Generierung von Gedächtnis T-Zellen	7
1.1.5	Eigenschaften und Subpopulationen von Gedächtnis T-Zellen	9
1.2	Tumorimmunologie	10
1.3	Das Mammakarzinom	15
1.4	Das Multiple Myelom	15
1.5	Tumor-assoziierte Antigene	16
1.6	Aufgabenstellung	19
2	Material	20
2.1	Geräte	20
2.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.3	Chemikalien	22
2.4	Zellen	24
2.4.1	Humane Primärzellen	24
2.4.2	Etablierte humane Zelllinien	24
2.5	Medien und Mediensupplemente	25
2.6	Zytokine	25
2.7	Antikörper, ELISpot und ELISA-Kits	26
2.7.1	Nicht-konjugierte und Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper	26
2.7.2	Isotypen-Kontrolle, Zweit- und Dritt-Antikörper	27
2.7.3	Dynabeads®	27
2.7.4	MACS MicroBeads®	28
2.7.5	ELISpot-Kits	28
2.7.6	ELISA-Kits	28
2.8	Proteine, Peptide und Tetramere	28
2.9	Tiere	29
2.10	Zusätzliche Software	29
3	Methoden	30
3.1	Zellbiologische Methoden	30
3.1.1	Lösungen und Puffer	30

3.1.2 Medien und Mediensupplemente	30
3.1.3 Kultivierung von Zellen	32
3.1.3.1 Zellkulturbedingungen	32
3.1.3.2 Kultivierung von humanen Primärzellen	32
3.1.3.3 Kultivierung von Tumorzellen	32
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
3.1.5 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	33
3.2 Proteinchemische Methoden	34
3.2.1 Herstellung von Lysaten	34
3.2.1.1 Herstellung von Gewebelysaten	34
3.2.1.2 Herstellung von Zell-Lysaten	34
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.2.3 Lösen von Peptiden	35
3.3 Immunbiologische Methoden	36
3.3.1 Lösungen und Medien	36
3.3.2 Organisches Material von Patienten und gesunden Spendern	37
3.3.3 Isolierung und Kultivierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark	37
3.3.4 Isolierung spezifischer Immunzell-Populationen über Zelloberflächen- moleküle	38
3.3.4.1 Isolierung von Lymphozyten mit Hilfe der magnetischen Separation über Dynabeads®	38
3.3.4.1.1 Anreicherung von T-Lymphozyten mit Dynabeads® ...	38
3.3.4.1.2 Anreicherung von Dendritischen Zellen mit Dynabeads®	39
3.3.4.2 Isolierung von naiven und Gedächtnis T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Separation über MACS-MicroBeads®	40
3.3.5 Antigenbeladung von Dendritischen Zellen	40
3.3.6 ELISpot-Test (enzyme-linked immunospot assay)	41
3.3.7 IFN- γ Sekretions-Test	43
3.3.8 ELISA-Test (enzyme-linked immunosorbent assay)	44
3.3.8.1 IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-15 ELISA-Tests von BD Pharmingen ..	45
3.3.8.2 IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-12 ELISA-Tests von R&D Systems	45
3.3.8.3 TGF- β 1 ELISA-Test von R&D Systems	46
3.3.8.3.1 Aktivierung von latentem TGF- β 1	46
3.3.8.3.2 Durchführung des TGF- β 1 ELISA-Tests	46
3.3.8.4 PGE ₂ -ELISA-Test von R&D-Systems	46

3.3.8.4.1	Säulen-Extraktion von PGE ₂ aus Gewebe- und MCF7-Zell-Lysaten	46
3.3.8.4.2	Durchführung des PGE ₂ -ELISA-Tests	47
3.3.9	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest (Zytotoxizitätstest)	47
3.3.10	Stimulationsprotokolle zum Nachweis intrazellulärer Moleküle mit Hilfe der Durchflußzytometrie	49
3.3.11	Durchflußzytometrie und Immunfluoreszenz	50
3.3.11.1	Nachweis von Oberflächenmolekülen	50
3.3.11.2	Nachweis von intrazellulären Molekülen	51
3.3.11.3	Nachweis von toten Zellen durch Propidiumjodid-Inkorporation	51
3.3.11.4	Bestimmung von apoptotischen Zellen	52
3.3.11.4.1	Färbung von Phosphatidylserin durch Annexin V	52
3.3.11.4.2	Intrazelluläre Färbung mit Apo2.7	52
3.3.11.5	Identifizierung von HLA-A2 positiven Lymphozyten	52
3.3.11.6	Tetramer-Färbung	53
3.3.11.7	Sortierung von CM und EM T-Zellen mit Hilfe des FACS-Vantage	54
3.4	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	54
3.4.1	Schneiden und Fixieren	54
3.4.2	Einfachfärbungen mit Enzym-konjugierten Zweitantikörpern	55
3.4.3	Mehrfachfärbungen	55
3.5	Tierexperimentelle Methoden	55
3.5.1	Subkutane Injektion von U266 Tumorzellen in NOD/Scid-Mäuse	55
3.5.2	Sezierung von Maustumoren	56
3.5.3	Adoptiver Transfer von reaktivierten T-Lymphozyten	56
4	Ergebnisse	57
4.1	Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigen spezifischen T-Zellen beim Multiplen Myelom	57
4.1.1	Detektion MUC 1-spezifischer Gedächtnis CD8 T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom	57
4.1.2	Nachweis MUC 1-reaktiver Gedächtnis T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom	61
4.1.3	Identifizierung zytotoxischer MUC 1-reaktiver Gedächtnis T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom	64
4.1.4	Perforin-Induktion durch MUC 1-Stimulation in zytotoxischen Effektor T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei MM-Patienten	65

4.1.5 Nachweis einer Ko-Lokalisation von CD8 T-Zellen und MUC 1- exprimierenden Zellen in Gefrierschnitten von Knochenmark-Stanzen MM-Patienten	68
4.2 Charakterisierung reaktiver T-Zellen in funktionalen T-Zell Experimenten	70
4.2.1 Anreicherung Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen in der Effektor Gedächtnis Zellpopulation bei Mammakarzinom	70
4.2.2 Anreicherung IFN- γ produzierender T-Zellen in der Effektor Gedächtnis T-Zellpopulation	80
4.2.3 Apoptose von IFN- γ produzierenden EM und CM T-Zellen in Korrelation mit Expression von CCR7 nach Aktivierung	90
4.2.4 Analyse des Zytokinprofils von reaktivierten Tumorspezifischen Knochenmark und Blut Gedächtnis T-Zellen beim Mammakarzinom	101
4.2.5 Analyse des Zytokinprofils von autologem Tumorlysate und Plasma von Mammakarzinom-Patienten	111
4.2.6 Untersuchung der Zytokinproduktion von T-Zell-Subpopulationen beim Mammakarzinom	119
5 Diskussion	123
6 Zusammenfassung	142
7 Literaturverzeichnis	143
8 Anhang	174
8.1 Abkürzungsverzeichnis	174
8.2 Präliminäre Ergebnisse	178
8.2.1 Etablierung eines NOD/Scid-mausmodells für Myelomzell-Linien zur therapeutischen T-Zell-Testung in vivo	178
8.2.2 Expression von MHC Klasse I HLA-A2 auf der Myelom Zell-Linie U266 ..	179
8.2.3 Nachweis der MUC-1 Expression auf U266 Myelomzellen	179
8.2.4 Transplantation von U266 Myelomzellen in NOD/Scid-Mäuse	180
8.2.5 Adoptive Immuntherapie von U266 tumortragenden NOD/Scid-Mäusen mit MUC-1 reaktivierten T-Zellen von MM Patienten	181
8.2.6 Verlust der MUC-1 Expression in U266 tumortragenden NOD/Scid- Mäusen nach adoptiver Immuntherapie	182
8.2.7 Analyse von IL-15 Plasma-Konzentrationen beim Mammakarzinom	183
Beiträge zu wissenschaftlichen Publikationen und Konferenzen	184
Danksagung	186
Lebenslauf	187

1 Einleitung

Die Zielsetzung der Arbeit war zu klären, inwieweit Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen bei einer Tumorerkrankung generiert und erhalten werden. Ferner sollte eine phänotypische und funktionale Charakterisierung von Tumor-spezifischen Gedächtnis T-Zellen vorgenommen werden.

1.1 Die T-Zell-vermittelte Immunität

T-Zellen werden aus Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet, wandern jedoch in einem frühen Stadium für ihre Differenzierung in den Thymus, welches ein spezialisiertes Mikromilieu für die Rekombination der Rezeptorgene und die Reifung der T-Zellen bietet. Die T-Zellentwicklung umfasst dabei zwei Arten der Auslese: die positive und negative Selektion. T-Zellen, die Peptide im Komplex mit eigenen MHC(*major histocompatibility complex*)-Molekülen erkennen, werden im Thymus positiv selektiert, während solche, die gegen körpereigene, an eigenen MHC-Molekülen gebundene Peptide stark reagieren, eliminiert werden (Stockinger 1999).

Der entscheidende erste Schritt der adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) zur Proliferation und Differenzierung zu bewaffneten Effektorzellen. Es können zwei Hauptklassen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen unterschieden werden: 1) *Zytotoxische CD8* T-Zellen töten Zielzellen, die mit intrazellulär wachsenden Krankheitserregern infiziert sind, 2) *T-Helfer CD4* T-Zellen beteiligen sich an der Aktivierung der Immunantworten anderer Leukozyten, insbesondere durch die Freisetzung lokaler Mediatoren, wie z.B. den Zytokinen. T-Helfer Zellen lassen sich in zwei Haupttypen unterscheiden: TH1-Zellen aktivieren Makrophagen zur Zerstörung von aufgenommenen Mikroorganismen, TH2-Zellen stimulieren B-Zellen zur Proliferation und Sekretion von Antikörpern (Liew 2002). Darüber hinaus wurde innerhalb der T-Helfer Zellen eine Subpopulation von nicht-polarisierten TH0-Zellen identifiziert, deren physiologische Relevanz jedoch bisher unklar ist (Lanzavecchia and Sallusto 2000a).

1.1.1 Die Antigenerkennung

Die Antigenerkennung während der adaptiven Immunantwort wird durch hochvariable Antigen-spezifische Rezeptoren der T-Zellen vermittelt. Der Ligand des T-Zellrezeptors (TZR) besteht aus einem vom Fremdantigen stammenden Peptid, das an ein MHC-Molekül gebunden ist (Paul 2003).

MHC-Moleküle sind Glykoproteine und werden als Klasse I bzw. Klasse II auf der Oberfläche von Zellen exprimiert. Intrazelluläre Proteine werden innerhalb der Zelle prozessiert, am endoplasmatischen Retikulum an MHC Klasse I Moleküle gebunden und schließlich zur Antigenpräsentation an die Zelloberfläche transportiert. MHC Klasse II Moleküle präsentieren dagegen in der Regel Peptide extrazellulärer Fremdproteine, die nach Aufnahme und Prozessierung in spezialisierten Kompartimenten an MHC II Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche gebracht werden (Janeway and Travers 2001). MHC Klasse I Moleküle präsentieren jedoch ebenfalls Peptide, die von aufgenommenen Proteinen abstammen (Lanzavecchia 1996), und vice versa können MHC Klasse II Moleküle Peptide von prozessierten intrazellulären Proteinen präsentieren (Pieters 1997). Diesen Mechanismus bezeichnet man als Kreuz-Präsentation (*cross-presentation*).

Zytotoxische CD8 T-Zellen erkennen Peptide in Kombination mit MHC Klasse I Molekülen, T-Helfer CD4 T-Zellen dagegen in Kombination mit MHC Klasse II (Paul 2003). Jede T-Zelle exprimiert einen T-Zellrezeptor, der bei den meisten T-Zellen aus α - und β -Ketten zusammengesetzt ist. Die Signalübertragung wird durch den CD3-Komplex vermittelt, der mit dem T-Zellrezeptor und einem Homodimer aus ζ -Ketten assoziiert ist. CD4 bzw. CD8 Co-Rezeptoren unterstützen die Antigenerkennung, indem sie die Empfindlichkeit der T-Zellen für ein Antigen um ungefähr das 100fache erhöhen (Janeway and Travers 2001).

Die Wechselwirkungen zwischen einer T-Zelle und einer Antigenpräsentierenden Zelle während dem Prozeß der Antigenerkennung führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, bei der spezifische Liganden und costimulatorische Moleküle an der Initiation und Erhaltung des T-Zellaktivierungsprozesses beteiligt sind (Huppa and Davis 2003).

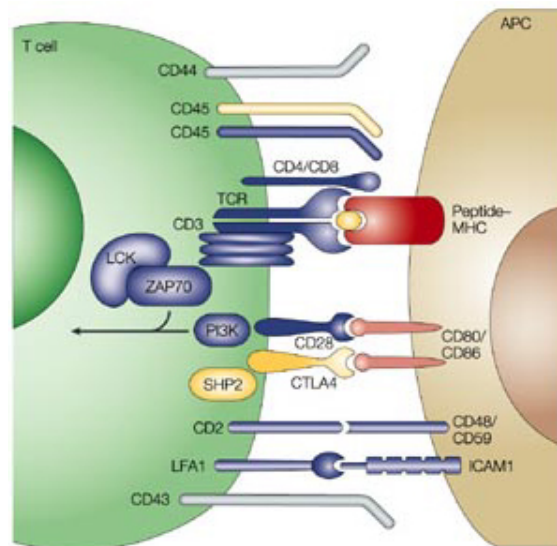


Abb. 1 Übersicht der immunologischen Synapse.

Die Profilansicht zeigt eine Selektion der wichtigsten Ligandenpaare und Signalmoleküle, die bei der T-Zell-Erkennung involviert sind. Dargestellt sind Wechselwirkungen zwischen Peptid-MHC Komplex auf der APC und T-Zellrezeptor mit assoziiertem CD3-Komplex, CD4- bzw. CD8 Corezeptor und CD45 Phosphatase, die eine Aktivierung Rezeptor-assoziiierter Kinasen erlaubt. Costimulatorische bzw. inhibitorische Signale werden durch CD80/86-Bindung an CD28 bzw. CTLA4 über PI₃-Kinase bzw. eine Phosphatase (SHP2) vermittelt. Signaltransduktionsmoleküle (ZAP70, Lck) leiten das Aktivierungssignal in das Zellinnere weiter. CD2-CD48/58 Interaktionen tragen zur Stimulation und Adhäsion bei. Eine Wechselwirkung zwischen den Adhäsionsmolekülen LFA-1 und ICAM1 führt zu einer zusätzlichen Stabilisierung der Synapse.

(Abbildung aus Huppa and Davis 2003)

1.1.2 Die T-Zellaktivierung

Die klassische Lehrmeinung der T-Zellaktivierung geht von einer Initiation primärer T-Zellantworten in sekundären lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, Milz und lymphoiden Gewebe des Magen-Darm-Trakts aus. Neuere Untersuchungen haben jedoch eine Induktion primärer Immunantworten ebenfalls in einem primären lymphatischen Organ, dem Knochenmark, belegt (Feuerer et al. 2003).

Für eine primäre Aktivierung (*priming*) naiver T-Zellen zu bewaffneten Effektor T-Zellen ist die Erkennung von Fremdanigen über Selbst-MHC-Moleküle sowie die Co-Stimulation durch hochspezialisierte APZ erforderlich. Hierfür eignen sich unter den professionellen APZ nur Dendritische Zellen (DZ) und nicht Makrophagen oder manche B-Zellen (Jung et al. 2002).

DZ exhibieren Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, -2 (*intracellular adhesion molecule-1, -2*) und LFA-1, -3 (*lymphocyte function-associated antigen-1, -3*), die vorübergehende

Verbindungen zwischen T-Zellen und APZ stabilisieren (Ganpule et al. 1997). Darüber hinaus exprimieren sie die co-stimulierenden Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), welche an CD28 auf naiven T-Zellen binden und durch eine Vernetzung der CD28-Moleküle auf der T-Zelloberfläche eine Aktivierung und Proliferation von naiven T-Zellen induzieren (Paul 2003).

Aktiviert T-Zellen synthetisieren das Zytokin IL-2 und einen hochaffinen Interleukin (IL)-2 Rezeptor, deren Wechselwirkung eine klonale Expansion und eine nachfolgende Differenzierung der T-Zellen zu bewaffneten Effektor T-Zellen autokrin induziert. Einmal entstandene Effektorzellen benötigen keine weitere Co-Stimulation für eine Aktivierung. Naive CD8 T-Zellen können unterschiedlich aktiviert werden. Einige können allein durch starke APZ mit einer hohen B7-Expression stimuliert werden. Andere benötigen jedoch zusätzlich die Hilfe von aktivierten CD4 T-Zellen. Diese können CD8 T-Zellen entweder direkt durch sezerniertes IL-2 oder indirekt durch eine erhöhte Induktion von B7 auf APZ aktivieren (Janeway and Travers 1997).

Naive Zellen, die Antigene in Abwesenheit eines co-stimulierenden Signals erkennen, werden dagegen anergisch und lassen sich auch nicht weiter durch eine professionelle APZ stimulieren (Galluci and Matzinger 2001).

1.1.3 Eigenschaften bewaffneter Effektor T-Zellen

Die Effektorfunktionen von T-Zellen wird durch ein breites Spektrum an Effektormolekülen vermittelt. Zytotoxische Effektor-T-Zellen töten Zielzellen durch die Sekretion von Zytotoxinen wie Perforin und Granzyme ab, die in speziellen lytischen Granula gespeichert werden und bei Freisetzung die Membran der Zielzelle perforieren und im Zellinnern Apoptose, einen programmierten Zelltod, auslösen. Darüber hinaus kann Apoptose auch durch die Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an den Fas-Rezeptor (CD95) in CD95-exprimierenden Zielzellen induziert werden (Igney and Krammer 2002).

Weitere TZ-Effektormoleküle sind Zytokine. Sie sind häufig Glykoproteine, die von Zellen nicht innerhalb der Zellen gespeichert werden (außer TGF- β in Blutplättchen), sondern bei Zellaktivierung transient exprimiert und sekretiert werden. Sie sind nur auf kurze Distanz wirksam und haben eine kurze Halbwertszeit. Zytokine werden als lösliche und membrangebundene Signalmoleküle in Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (IFN) und Chemokine eingeteilt (Ibelgaufts 1995).

Zu den wichtigsten von TH1-Zellen produzierten Zytokinen gehört neben TNF- α/β das IFN- γ ; wichtige Effektormoleküle von TH2-Zellen sind u.a. IL-4 und IL-10. Professionelle

APZ wie Dendritische Zellen können Effektoreigenschaften von T-Zellen durch die Sekretion von IL-12, TGF- β , PGE₂, IL-15 beeinflussen (Mire-Sluis and Thorpe 1998).

IFN- γ

IFN- γ wird hauptsächlich von aktivierten CD8⁺ und CD4⁺ TH1 T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK) produziert. Es hat antivirale und antiparasitäre Eigenschaften und kann inhibitorisch auf die Proliferation von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie Tumorzellen wirken. IFN- γ fördert die T-Zell Reifung und verstärkt die Proliferation von ZTL und ihre Reaktivität auf andere Zytokine. Es stimuliert die Aktivierung von NK-Zellen, Makrophagen und Fibroblasten und erhöht deren Aktivität. Weiterhin inhibiert es die Zytokinproduktion von TH2 Zellen. Darüber hinaus induziert es Zelloberflächenmoleküle und -Rezeptoren, wie z.B. IL-2 Rezeptor und MHC Klasse II Moleküle auf T-Zellen, Fibroblasten und Tumorzellen (Mire-Sluis and Thorpe 1998).

IL-4

IL-4 wird u.a. von TH2-, TH0-Lymphozyten und Knochenmark Stromazellen produziert und wirkt v.a. auf T-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Die Synthese von IL-4 kann durch IL-2 induziert und durch TGF- β gehemmt werden. IL-4 stimuliert die Proliferation von Fibroblasten, die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen zu DZ und die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten. Gleichzeitig wirkt IL-4 jedoch anti-inflammatorisch durch die Inhibition der TNF- α Sekretion durch Monozyten und T-Zellen. Es ist ein essentieller Regulator von T-Helfer-Antworten, indem es die TH2 Differenzierung fördert und die Entwicklung und IFN- γ Sekretion von TH1 T-Zellen hemmt (Ibelgaufts 1995).

IL-10

IL-10 spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse und hemmt allergische und Autoimmun-Reaktionen. Es wird neben TH2-Zellen von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen sezerniert, kann jedoch u.a. auch von regulatorischen CD4 T-Zellen, CD8 T-Zellen und NK T-Zellen produziert werden. Inhibitorische Effekte von IL-10 betreffen antimikrobielle Effektorfunktionen, die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, die Differenzierung und immunstimulatorische Funktionen von Dendritischen Zellen, T-Zellproliferation und Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten. IL-10 inhibiert die Entwicklung und die Aktivierung von TH1 Zellen und begleitend die Synthese von IL-12, IFN- γ und TNF. Darüber hinaus hemmt es die Aktivierung sowie akzessorischen und antigenpräsentierenden Funktionen von

Makrophagen, u.a. durch Reduktion der MHC Klasse II Expression und Hemmung der Produktion oder Funktion von membrangebunden Costimulatoren zur TZ- und NK-Zell-Aktivierung und inhibiert somit die Monozyten/Makrophagen-vermittelte Antigen-stimulierte Zytokinproduktion und Proliferation von T-Zellen und NK-Zellen (Mire-Sluis and Thorpe 1998).

IL-12

Biologisch aktives IL-12p70 ist ein 70kDa-Heterodimer aus einer 40kDa- (p40) und einer 35kDa Untereinheit (p35), die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. IL-12 wird hauptsächlich von aktivierten Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen produziert. Es kann durch Pathogene (Bakterien, Pilze, intrazelluläre Parasiten und Viren), durch membrangebundene und lösliche Signale von T-Zellen sowie durch Komponenten von inflammatorischer extrazellulärer Matrix induziert werden. In NK-Zellen, NK T-Zellen und T-Zellen induziert es Proliferation, verstärkt die Zytotoxizität und Expression zytotoxischer Mediatoren und erhöht die Produktion von IFN- γ . Es fördert die Differenzierung von Typ-1 Zytokin-sezernierenden Zellen (v.a. TH1- und NK1-Zellen). Darüber hinaus kann es die Synthese von IL-2 und TNF in TH1 Zellen fördern und die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-10 reduzieren (Tinchieri 2003, Mire-Sluis and Thorpe 1998).

IL-15

IL-15 stimuliert die homöostatische Proliferation von aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und Tumor-infiltrierender Lymphozyten (TIL), fördert die Bildung von zytotoxischen Effektorzellen und erhöht die Aktivität Lymphokin-aktivierter Killerzellen (LAK) in NK-Zellen. Es verstärkt die IFN- γ - und TNF- α -Sekretion von stimulierten T-Zellen, vermittelt das Überleben aktivierter T-Zellen (Vella 1998), fördert die Generierung und Erhaltung von Gedächtniszellen und hemmt die Fas-induzierte Apoptose in Effektor Gedächtnis T-Zellen (Schluns 2002). IL-15 wird von vielen Geweben und Zelltypen produziert, u.a. von antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Plasmazellen sowie von Fibroblasten, Skelettmuskelzellen und manchen Stromazellen.

TGF- β 1

TGF- β hemmt die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen, v.a. durch Inhibition der IL-2 Produktion und Hemmung des Erwerbs von Effektorfunktionen nach Aktivierung. Nichtdifferenzierte TH2 Zellen werden stärker von TGF- β inhibiert als TH1 Zellen (Gorelik

and Flavell 2002, Mire-Sluis and Thorpe 1998). Im Gegensatz dazu werden vollständig differenzierte Gedächtnis TH2 Zellen gegenüber TGF- β unsensitiv und Gedächtnis TH1 Zellen in ihrer IFN- γ Produktion inhibiert (Lúdvíksson et al. 2000). Es wirkt immunsuppressiv auf antigenpräsentierende Zellen, indem es die Hochregulation von MHC Klasse II Molekülen, die Aktivierung von Makrophagen und ihre Produktion proinflammatorischer Mediatoren, die Reifung von Dendritischen Zellen und ihre Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren sowie die Migration von Langerhanszellen aus der Haut in den Lymphknoten hemmt (Gorelik and Flavell 2002).

PGE₂

PGE₂ wird von vielen Körperzellen produziert, u.a. von Fibroblasten, Dendritische Zellen, Makrophagen und manchen malignen Zellen. PGE₂ inhibiert die Proliferation von T-Zellen, verstärkt die Ausschüttung von TH2-Zytokinen und wirkt hemmend auf die Produktion von TH1-Zytokinen. Es löst Apoptose in ruhenden, unreifen T-Zellen aus, hemmt sie jedoch in aktivierten, reifen T-Zellen. PGE₂ induziert in DZ eine komplette Inhibierung der IL-12 Sekretion, die Produktion hoher Mengen an IL-10 und die Stimulation von TH2-Differenzierung naiver T-Zellen (rezensiert in Harris et al. 2002).

1.1.4 Generierung von Gedächtnis T-Zellen

Das Immunsystem hat nur eine begrenzte Anzahl an sogenannten „Nischen“ für Populationen an naiven, Effektor- und Gedächtnis T-Zellen. Daher ist eine homöostatische Regulation für die Aufrechterhaltung eines konstanten Verhältnisses zwischen den einzelnen TZ-Populationen im Ruhezustand erforderlich (Gray 2001).

Im Verlauf einer typischen akuten Infektion kommt es nach einer Induktion der adaptiven Immunantwort zur einer schnellen und starken Expansion mit nachfolgender Differenzierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Nachdem die gebildeten Effektor T-Zellen die Infektion beseitigt haben, wird der ursprüngliche homöostatische Zustand durch eine Elimination der generierten Effektorzellen wiederhergestellt. Dieser Vorgang wird über eine Apoptose-Induktion vermittelt und als *activation-induced cell death* (AICD) bezeichnet. Es folgt ein Zustand schützender Immunität, der auf einem immunologischen Gedächtnis beruht und durch klonal expandierte Antigen-spezifische Lymphozyten, den Gedächtniszellen, vermittelt wird. Auf welchem Wege die Generierung von Gedächtnis T-Zellen genau erfolgt, ist bisher unklar. Es existieren mehrere unterschiedliche

Differenzierungsmodelle. Nach klassischer Sicht („*linear differentiation model*“) entstehen Gedächtnis T-Zellen aus einer kleinen Population Antigen-spezifischer Effektor T-Zellen, die nach Beseitigung der primären Infektion vor AICD verschont werden. Ein alternatives Modell („*decreasing potential hypothesis*“) beschreibt einen parallel zur Effektor T-Zell-Entwicklung verlaufenden Differenzierungsweg von Gedächtnis T-Zellen, der durch die Höhe und Dauer der Stimulation beeinflusst wird. Dem Modell zufolge nimmt mit anhaltender Stimulation die Differenzierung von Effektor T-Zellen zu. Gleichzeitig kommt es jedoch zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Apoptose und einer Abnahme der Effektorzell-Funktionen, wie es in chronischen Infektionen beobachtet werden konnte. Dies resultiert in einem erniedrigten Potenzial von Effektorzellen, mit zunehmender Differenzierung Gedächtnis T-Zellen generieren zu können (rezensiert in Ahmed and Gray 1996, Kaech et al. 2002). Neuere Untersuchungen unterstützen stark das lineare Differenzierungsmodell (Opfermann et al. 1999, Kaech and Ahmed 2001). Naive CD8 T-Zellen durchliefen nach Antigen-spezifischer Aktivierung einen programmierten Entwicklungsprozess über zytotoxische Effektorzellen zu Gedächtniszellen, der unabhängig von einer fortwährenden Antigenstimulation war (Kaech and Ahmed 2001). Ein linearer Entwicklungsweg über Effektor T-Zellen scheint jedoch keine essentielle Grundvoraussetzung für die Generierung zytotoxischer Gedächtnis T-Zellen zu sein. Eine Kultivierung Antigen-aktivierter naiver T-Zellen mit IL-15 oder geringen Dosen von IL-2 führte zu einer direkten Entwicklung von Gedächtnis T-Zellen (Manjunath et al. 2001). Das daraufhin vorgeschlagene „*progressive T-cell differentiation model*“ (Lanzavecchia and Sallusto 2000b) integriert die Generierung beider Untergruppen der heterogenen Gedächtnis Zellpopulation, der Zentralen (CM) und Effektor (EM) Gedächtnis T-Zellen (siehe 1.2.5). Dem Modell nach entwickeln sich naive T-Zellen nach einer länger anhaltenden TZR-Stimulation und/oder in Gegenwart polarisierender Zytokine wie IL-12, IL-4 oder hohen Dosen von IL-2 zu Effektor T-Zellen, die nach einer sekundären Antigenstimulation zu EM differenzieren können. Dagegen entwickeln sich naive T-Zellen, die über eine kürzer anhaltende TZR-Stimulation und/oder in Abwesenheit von polarisierenden Zytokinen bzw. Gegenwart von IL-15, niedrigen Dosen IL-2 oder TGF- β aktiviert wurden, zu T-Zellen mit fehlenden Effektor-Eigenschaften, die weiter zu CM differenzieren können.

1.1.5 Eigenschaften und Subpopulationen von Gedächtnis T-Zellen

Ein wesentliches Charakteristikum von immunologischen Gedächtnis T-Zellen ist ihre Persistenz über längere Zeit. Sie können in der Peripherie auch lange nach Antigenstimulation überleben und sogar proliferieren, wobei eine Persistenz des spezifischen Antigens (Lau et al. 1994, Mullbacher 1994, Veiga-Fernandes et al. 2000) oder die Gegenwart von MHC Molekülen (Murali-Krishna et al. 1999, Swain et al. 1999, Hu et al. 2001) nicht absolut erforderlich ist.

Gedächtniszellen unterscheiden sich in vielerlei funktioneller Hinsicht von naiven Zellen: i) Ansprechbarkeit auf geringere Antigenkonzentrationen, ii) schnellere Proliferation nach Antigenstimulation, iii) schnellere Exhibierung ihrer Effektorfunktionen, iv) Fähigkeit, ein größeres Spektrum an Zytokinen auszuschütten und v) Expression von Adhäsionsmolekülen zum Eintritt in periphere Gewebe (Zinkernagel et al. 1996, Goldrath and Bevan 1999, Westermann et al. 2001, Jameson 2002). Gedächtnis T-Zellen sind weniger abhängig von Co-Stimulation durch Antigenpräsentierende Zellen (Veiga-Fernandes et al. 2000, Tuma and Palmer 2002, Lanzavecchia and Sallusto 2000b), ähneln jedoch naiven T-Zellen hinsichtlich einer langsamen Entwicklung zytolytischer Funktionen (Bachmann et al. 1999a). Die von Gedächtnis T-Zellen ausgehenden sekundären Immunantworten sind naiven Primärantworten weit überlegen, so dass sich Gedächtnis T-Zellen daher besonders gut als Ausgangszellen zur Generierung einer zytotoxischen Effektorpopulation eignen.

Gedächtnis T-Zellen lassen sich von naiven T-Zellen mit Hilfe verschiedener phänotypischer Marker unterscheiden. Im humanen System gehören dazu CD45 Isoformen, β -Integrine, CD62L (L-Selektin) und der Chemokinrezeptor CCR7 (Zinkernagel et al. 1996, Goldrath and Bevan 1999, Lanzavecchia and Sallusto 2000b). Die verschiedenen Isoformen von CD45 werden unterschiedlich auf naiven und Gedächtnis T-Zellen exprimiert. Die niedrige Molekulargewicht (MW)-Isoform CD45R0 ist bevorzugt auf Gedächtnis und die hohe MW-Isoform CD45RA ist vor allem auf naiven T-Zellen präsent (Michie et al. 1992). CD62L und CCR7 sind für den Eintritt in Lymphknoten durch „high endothelial venules“ (HEV) erforderlich und sind auf allen naiven Zellen stark exprimiert (Butcher et al. 1999, Forster et al. 1999). Ihre Expression auf Gedächtnis T-Zellen ist dagegen heterogen und ermöglicht die Unterscheidung zweier Subpopulationen: CCR7⁺/CD62L⁺ CM T-Zellen und CCR7⁻/CD62L⁻ EM T-Zellen (Sallusto et al. 1999). CM T-Zellen sind aufgrund ihres Phänotyps stark in Lymphknoten angereichert, während EM T-Zellen eher in nicht-lymphatischen Geweben, in der Milz oder im Knochenmark vorkommen (Sallusto et al. 1999, Masopust et al. 2001, Wherry et al. 2003). Neben polarisierten migratorischen Eigenschaften wurden auch funktionale Unterschiede

zwischen CM und EM T-Zellen beschrieben. CM T-Zellen produzierten große Mengen an IL-2 nach Aktivierung, waren jedoch nicht in der Lage, sofortige Effektorantworten wie IFN- γ - oder Perforin-Sekretion zu generieren. EM T-Zellen exhibiten dagegen geringe IL-2 Produktion und sofortige Effektorfunktion (Sallusto et al. 1999). Kontroverse Studien in transgenen Mausmodellen berichten allerdings von einer gleichwertigen unmittelbaren Effektorkapazität beider Gedächtnis Zellpopulationen (Wherry et al. 2003, Unsoeld et al. 2002).

1.2 Tumorimmunologie

Krebs kann als Ursache des progressiven Wachstums einer einzelnen transformierten Zelle betrachtet werden. Eine naheliegende Idee für eine Krebstherapie wäre, Tumorspezifische Immunantworten in Patienten zu induzieren, die selektiv zwischen den malignen und gesunden Wirtszellen unterscheiden.

Eine derartige Spezifität und das damit verbundene geringere Risiko an Nebenwirkungen machen Immuntherapien zu einer attraktiven Alternative zu unspezifisch wirkenden Strahlen- und Chemotherapien, die starke negative Effekte auf Knochenmark, intestinales Epithelium, Haut, Haarfollikel und Immunsystem ausüben.

Eine Vielfalt an Experimenten hat bewiesen, dass Tumor-gerichtete Immunantworten sowohl in murinen als auch in humanen Systemen *in vitro* sowie *in vivo* ausgelöst werden können (Nagorsen et al. 2003, Prehn and Main 1957, Mukherji et al. 1990).

Neben der Induktion *angeborener* Immunantworten, wie z.B. durch Expression Transformations-assoziiierter Streßgene (Diefenbach and Raulet 2002), spielen insbesondere Reaktionen der *adaptiven* Immunität eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen (Smyth et al. 2001). So ist z.B. das natürliche Vorkommen einer humoralen Immunantwort mit einer guten Prognose in Brustkrebspatienten assoziiert (von Mensdorff-Pouilly et al. 2000). Unter allen Immunzellen stellen jedoch T-Lymphozyten die Effektorpopulation mit der stärksten Anti-Tumor Reaktivität dar (Wybran et al. 1974). Dieser Befund zusammen mit der molekularen Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) (van der Bruggen et al. 1991, Boon and van der Bruggen 1996, Rosenberg 1996, Old and Chen 1998) hat eine umfangreiche Charakterisierung von TAA-spezifischen T-Zellen eingeleitet, mit dem Ziel sie immuntherapeutisch einzusetzen. Eine Reihe von klinischen Studien konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass TAA-reaktive T-Zellen in Krebspatienten nicht nur induziert werden können

(rezensiert in Parmiani et al. 2002), sondern auch dass eine Induktion Tumor-spezifischer T-Zellen mit klinischen Effekten assoziiert war (Naito et al. 1998, Molldrem et al. 2000, Banchereau et al. 2001, Schumacher et al. 2001, Belli et al. 2001).

Diese Befunde stehen jedoch auf den ersten Blick im Widerspruch zu dem immunologischen Prinzip der negativen Selektion von T-Zellen. Demzufolge werden autoreaktive T-Zellen im Thymus negativ selektiert und eliminiert, um nachfolgend eine potentielle Induktion von Immunantworten gegen Selbstantigene auszuschließen (Medawar 1973). Allerdings können autoreaktive T-Zellen mit einer niedrigen Affinität zum Selbstantigen bei der negativen Selektion verschont werden. Da die Mehrheit der TAAs Selbstantigene sind (Wang 1999), kann es somit nur unter besonderen Umständen zur Aktivierung TAA-spezifischer T-Zellen kommen. Diese sind gegeben, wenn ein starker Aktivierungsstimulus auf Antigenpräsentierende Zellen wirkt, die dadurch besonders starke Aktivierungssignale an T-Zellen weiterleiten. So können Dendritische Zellen nicht nur durch Erkennung fremder mikrobieller Produkte, wie z.B. LPS, bakterieller CpG DNA oder viraler dsRNA, über Bindung an spezifische Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs) aktiviert werden (Medzhitov and Janeway 1998, 2002); nach dem „danger“-Modell von Matzinger (1998) können ebenfalls freigesetzte Selbstmoleküle von beschädigten oder nekrotischen Zellen, wie z.B. „heat shock“ Proteine oder mitochondriale Produkte, eine Expression co-stimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen induzieren (Gallucci and Matzinger 2001). Demzufolge könnten nekrotische Tumorzellen ebenfalls immunstimulatorisch auf Dendritische Zellen wirken. Dagegen scheinen apoptotische Zellen keinen solchen stimulatorischen Effekt auszuüben (Basu et al. 2000, Sauter et al. 2000).

Ein wichtiges Konzept der Immuntherapie ist daher die nötige Co-Stimulation bereitzustellen, um die Toleranz des körpereigenen Immunsystems gegen Tumorzellen aufgrund der geringen immunstimulatorischen Kapazität zu brechen und eine zellvermittelte Immunität zu induzieren. Strategien sind, die Immunogenität des Tumors zu erhöhen oder eine schwache Immunreaktion gegen die Tumorzellen passiv oder aktiv zu verstärken. Immuntherapien können allgemein in unspezifische und spezifische Strategien unterteilt werden, wobei sich letztere wiederum in passiven und aktiven Ansätzen unterscheiden. Die *unspezifische Immuntherapie* beruht auf dem Prinzip der generellen Aktivierung des Immunsystems mittels unspezifischer, immunstimulatorisch wirksamer Substanzen, wie bakteriellen Produkten (Coley 1894, Morton et al. 1991), Zytokinen oder akzessorischen Zellen, hat jedoch das häufige Auftreten starker Nebenwirkungen durch die Aktivierung natürlicher Abwehrmechanismen zur Folge (Ben-Efraim 1999). Die *passive spezifische Immuntherapie* bedient sich Tumorspezifischer

Antikörper zur Eliminierung von Tumorzellen. Die Anti-Tumor Wirkung wird durch Konjugation bakterieller Toxine, Radioisotope (Nelson 1991, Salzillo 1993) oder Enzyme zur Umwandlung von Zytostatikavorstufen (Bagshawe et al. 1988, Brinkmann et al. 1993, Goshorn et al. 1993) an tumorspezifische, monoklonale oder Einketten („single chain“) Antikörper erzielt.

Eine weitere Rolle bei der Bekämpfung maligner Erkrankungen spielen spezifische, T-Zell-vermittelte Immuntherapien, die generell in zwei Hauptgruppen unterteilt werden können.

Die eine Kategorie ist die aktive Therapie oder *Vakzinierung*, bei der eine *in vivo*-generierte bzw. verstärkte Immunantwort gegen Tumorantigene gerichtet wird. Diese Methode erfordert eine autologe Tumorprobe bzw. die Kenntnis der vom Tumor exprimierten TAAs. Die häufigsten Varianten sind die Vakzinierung mit Peptiden von Tumorantigen-Epitopen oder mit Dendritischen Zellen, die zuvor mit Tumorantigenen beladen wurden, z.B. mit Peptid, Protein, Antigen-RNA bzw. mit ganzen Tumorzellen fusioniert oder mit rekombinantem Antigen-codierendem Virus transduziert wurden (rezensiert in Pérez-Díez and Marincola 2002). Eine weitere Methode ist der Einsatz rekombinanter viraler Vakzine, d.h. Tumorantigen-codierender viraler Vektoren, die nach Infektion von Zellen die Expression des rekombinanten Tumorantigens induzieren oder zusätzlich Gefahrensignale zur Expression costimulatorischer Moleküle bereitstellen. Beispiele hierfür sind Vakzinia-Viren (Lathe et al. 1987) oder das Newcastle Disease Virus (NDV) (Schirmacher et al. 1998, Bai et al. 2002). Die immunstimulatorischen Eigenschaften NDV-infizierter Tumorzellen (Schirmacher et al. 1999, Washburn and Schirmacher 2002, Zeng et al. 2002, Fournier et al. 2003) konnten dabei in murinen sowie humanen Systemen therapeutische Erfolge erzielen (Termeer et al. 2000, Ahlert et al. 1997, von Hoegen et al. 1990, Pomer et al. 1995, Schirmacher, in press). Weitere Ansätze sind DNA-Vakzinierung oder somatische Gentherapie, die die Reparatur, Deletion oder den Transfer von Genen ermöglichen, durch Injektion von nackter DNA, DNA-Liposom-Komplexen, viralen oder Protein-Vektoren (Akbari et al. 1999, Pisetsky 1996).

Die zweite Kategorie ist die *adoptive Therapie*, die auf einem Transfer *in vitro*-generierter und/oder expandierter TAA-spezifischer Lymphozyten beruht und sich mit dem Einsatz von Zytokinen oft ihrer immunstimulatorischen Wirkung bedient. Beispiele hierfür sind der Transfer von Tumor-spezifischen IL-2 expandierten TILs oder LAKs, TAA-stimulierten CD8 T-Zellen und TZR-transduzierten PBLs (rezensiert in Pérez-Díez and Marincola 2002). In einer neueren Studie induzierte der adoptive Transfer TAA-reaktiver Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark von Brustkrebs-Patienten eine Tumorregression in einem autologem NOD/Scid Mausmodell (Feuerer et al. 2001b).

Dabei scheint dem Knochenmark verglichen zum peripheren Blut eine besondere Rolle bei einer Tumor-gerichteten T-Zell Immunität zuzukommen. Erstens, reichern sich Antigenspezifische Gedächtnis T-Zellen im Verlauf einer Virusinfektion (Marshall 2001) oder Tumorerkrankung (Feurerer et al. 2001a, 2001b) im Knochenmark an. Gedächtnis T-Zellen könnten aufgrund ihrer einzigartigen Qualitäten eine bedeutende Rolle in der Induktion einer Anti-Tumor Immunität spielen. Zweitens, scheint das Knochenmark ein bevorzugter Ort disseminierter ruhender Tumorzellen darzustellen, wobei Tumorspezifische T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion und Erhaltung dieses Ruhezustands („tumor dormancy“) spielen (Schirmmacher et al. 2002). Drittens, wurde kürzlich belegt, dass naive, Antigen-spezifische T-Zellen – entgegen dem klassischen immunologischen Konzept – ebenfalls im Knochenmark als primäres lymphatisches Organ eine primäre Aktivierung erfahren können (Feurerer et al. 2003). Viertens, konnten im Knochenmark angereicherte TAA-spezifische Gedächtnis T-Zellen aus Melanom- und Brustkrebspatienten zu einer Anti-Tumorantwort reaktiviert werden (Letsch 2003, Feuerer et al. 2001b). Dagegen konnte in TAA-spezifischen Gedächtnis T-Zellen aus dem peripheren Blut, wenngleich in ähnlicher Frequenz wie jene aus dem Knochenmark vorhanden, keine funktionale Reaktivität induziert werden. Unklar ist, ob diese funktionale Divergenz nur bei soliden Tumoren (z.B. beim Malignen Melanom, Mammakarzinom) auftritt, oder ob sie generell beobachtet werden kann, wie z.B. bei hämatologischen Neoplasien, wie dem Multiplen Myelom. Die Unterschiede in der Anti-Tumorreaktivität zwischen Knochenmark- und Blut-T-Zellen von Mammakarzinom-Patienten (Feurerer et al. 2001b) beruhte auf der Untersuchung von TAA-spezifischen TH1- und zytotoxischen Antworten. Allerdings können tumorspezifische CD4 T-Zell-vermittelte Immunantworten eine essentielle Rolle bei der Induktion und Aktivierung von TAA-spezifischen CD8 T-Zellen spielen (Gao et al. 2002). So sind beispielsweise in der Literatur direkt TAA-spezifische CD4 T-Zellantworten gegen Her-2/neu beim Mammakarzinom und gegen Prostata-spezifisches Antigen bei Prostatakrebs beschrieben worden (Disis et al. 2000, McNeel et al. 2001) sowie indirekt über die Detektion TAA-spezifischer Antikörperantworten gegen Her-2/neu, NY-ESO1, Tyrosinase u.a. (Pupa et al. 1993, Fishman et al. 1997, Jager et al. 1999). Folglich könnten Gedächtnis T-Zellen, die sich nicht zu IFN- γ produzierenden TH1 Effektorzellen reaktivieren lassen, stattdessen eine tumorspezifische TH2 Immunantwort bzw. IL-10 vermittelte Toleranz induzieren. Des weiteren ist unklar, inwiefern sich beide Subpopulationen von Gedächtnis T-Zellen, CM und EM T-Zellen, nach Aktivierung funktional in der Induktion einer Immunantwort sowie in ihrer Proliferationskapazität und Viabilität unterscheiden und damit unterschiedlich zu einer Anti-Tumorantwort beitragen könnten.

Überraschenderweise ist eine Induktion bzw. Verstärkung von Antitumor-Immunantworten oft nicht mit einer Tumorregression assoziiert (Nestle et al. 1998, Cormier et al. 1997). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine quantitativ und/oder qualitativ unzureichende wenngleich detektierbare Immunantwort sein. Dies könnte durch unzureichende Infiltration sowie durch mangelnde Persistenz der Effektor-Immunzellen im Tumorgewebe verursacht werden aufgrund einer ungenügenden oder fehlenden kontinuierlichen Stimulation. Tatsächlich belegen klinische Studien eine starke Korrelation zwischen Präsenz dichter T-Zell-Infiltrate im Tumor und dem klinischen Ausgang in Patienten mit Melanom, Kolon-, Nieren- und Ovarialkarzinom (Mihm et al. 1996, Zhang et al. 2003, Naito et al. 1998, Schumacher et al. 2001). Ebenso konnten Yee et al. (2000) zeigen, dass erst nach dem dritten adoptiven Transfer eine höhere Tumor-Infiltration und Persistenz im Blut transferierter Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen in den behandelten Patienten erzielt werden konnte. Dabei scheint die Frequenz Tumorantigen-spezifischer ZTL mit der Anzahl und Häufigkeit von Immunisierungen anzusteigen (Monsurro et al. 2001). Wenngleich eine T-Zell-Infiltration im Rahmen einer Immunantwort am Tumorort essentiell notwendig ist, führt dies nicht immer zu einer Tumorregression (Pockaj et al. 1994).

Weitere Faktoren können ebenfalls die Effektorfunktionen von T-Zellen beeinflussen. So sind Tumore in der Lage, sich einer Immunantwort durch aktive („tumour counterattack“) sowie passive („tumour escape“) Mechanismen zu entziehen (rezensiert in Marincola et al. 2000). So kann die Tumor-Mikroumgebung eine Sensitivität des Tumors gegenüber systemische Immunantworten modulieren. Eine Produktion immunsuppressiver Zytokine durch Tumorzellen, wie z.B. TGF- β 1, IL-10 oder PGE₂, kann die Effektorfunktionen von T-Zellen oder ihre Induktion sowie die Entwicklung und Aktivierung von Dendritischen Zellen teilweise oder vollständig hemmen (Mocellin et al. 2001a, Vicari et al. 2002). Die Gegenwart bestimmter Zytokine bei der Aktivierung von Dendritischen Zellen am Tumorort kann ihre spätere Produktion von T-Zell-polarisierenden Zytokinen beeinflussen (Lanzavecchia and Sallusto 2000a). Somit könnte das Zytokinprofil in der Tumor-Mikroumgebung indirekt eine Polarisierung von T-Zellen und damit die Art der induzierten Immunantwort regulieren. In einem solchen Falle bestünde die Möglichkeit unterschiedlicher T-Zell-Polarisierungen zwischen Tumorfernen (Knochenmark) und Tumornahen Kompartimenten (Lymphknoten, Milz). So könnten beispielsweise bei einer primären Aktivierung in Tumorfernem Knochenmark, residente Dendritische Zellen durch Aufnahme disseminierter Tumorzellen eine unterschiedliche T-Zell-Polarisierung induzieren aufgrund des fehlenden Einflusses des Tumorgewebes.

1.3 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit ca. 46.000 Neuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Insgesamt hat die Häufigkeit dieser Krebsform in Europa in den letzten 20 Jahren zugenommen. Jährlich sterben in Deutschland etwa 19.000 Frauen an Mammakarzinom (rezensiert aus dem Internet-Informationsmaterial der Deutschen Krebshilfe und der Krebsinformation).

In den letzten Jahren hat die Vakzinierung mit Dendritischen Zellen, fusioniert mit autologen Tumorzellen oder beladen mit Peptiden, Tumorlysaten bzw. Proteinen, vielversprechende Resultate in der Behandlung humaner maligner Erkrankungen erzielt. In Patienten mit fortgeschrittenem Mamma- und Ovarial-Karzinom führte eine Vakzinierung mit reifen, autologen DZ, die mit Her-2/neu oder MUC-1 Peptiden beladen wurden, selbst nach einer Hochdosis-Chemotherapie zu einer Induktion spezifischer ZTL-Antworten. In zwei Patienten konnte darüber hinaus nach mehreren MUC-1-Vakzinierungen eine Induktion CEA- und MAGE-3-spezifischer TZ-Antworten beobachtet werden („*epitope spreading*“) (Brossart et al. 2000).

Neben DZ-Vakzinierungen konnte in anderen klinischen Studien eine Vakzinierung mit Her-2/neu- oder MUC-1 Peptiden in Kombination mit Adjuvantien ebenfalls T-Zell- und Antikörper-vermittelte Immunantworten in Mammakarzinom-Patienten induzieren (Knutson et al. 2001, Plunkett et al. 2001).

1.4 Das Multiple Myelom

Das generalisierte Plasmozytom oder Multiple Myelom (MM) gehört zu den häufigsten hämatologischen Tumorerkrankungen in Deutschland. Die Inzidenz des MM beträgt 3 - 4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner, bei stark steigender Tendenz. Damit gehört diese Erkrankung zu den häufigsten 20 Tumorerkrankungen in Deutschland (Becker and Wahrendorf 1997).

Beim MM handelt es sich um eine B-Zellen Neoplasie. Bei der Erkrankung kommt es zu einer starken Vermehrung von Plasmazellen, die in der Regel zunächst im Knochenmark beginnt (Barlogie 1986). Das Wachstum der gesunden, blutbildenden Zellen im Knochenmark wird gehemmt, so dass gesunde weiße und rote Blutkörperchen sowie Blutplättchen vermindert produziert werden. Dies führt zu einer massiven Verringerung der Immunabwehr, die häufig Infektionen v.a. des HNO-Bereichs hervorruft (Informationsmaterial der Deutschen Krebshilfe).

In den letzten Jahren haben die hochdosierte Chemotherapie mit nachfolgender Blutstammzelltransplantation und die Einführung von Thalidomid die Remissionsrate

sowie das mittlere progressionsfreie Überleben der Patienten um ein Wesentliches erhöht (Attal et al. 1996, Goldschmidt et al. 1997, Singhal et al. 1999, Moehler et al. 2001). Dennoch sind dauerhafte komplette Remissionen äußerst selten und bei fast allen Patienten in Remission lassen sich residuale Zellen des Myelomklons nachweisen (Corradini et al. 1999, Cremer et al. 2000). Diese residualen Tumorzellen bilden die Ursprungszellen für das Rezidiv der Erkrankung. Eine Verbesserung der Langzeitprognose fordert daher die Kontrolle bzw. Eliminierung residualer Tumorzellen nach erfolgreicher zytostatischer Hochdosistherapie.

Ein vielversprechender Ansatz ist die adoptive T-Zell-vermittelte Immuntherapie, für dessen Anwendung die Kenntnis eines geeigneten Tumorantigens erforderlich ist. Beim MM und bei anderen B-Zell Malignomen kann der Idiotyp sowohl T- als auch B-Zell Immunantworten auslösen (Janeway et al. 1975, Bogen et al. 1986, Lauritzsen et al. 1994, Nelson et al. 1996, Hsu et al. 1996 and 1997, Trojan et al. 2000, Titzer et al. 2000, Wen et al. 2001). Allerdings waren die induzierten Immunantworten in den meisten Fällen nur relativ schwach. Neben dem Idiotyp wurden beim MM Antigene der MAGE Familie, HM 1.24 und das Oberflächenantigen MUC-1 als Tumor-assoziierte Antigene (TAA) identifiziert (van Baren et al. 1999, Ohtomo et al. 1999, Pellat-Deceunynck et al. 2000, Brossart et al. 2001), so wird beim MM z.B. MUC-1 als Tumor-assoziiertes Antigen auf ca. 90% aller malignen Plasmazellen überexprimiert wird.

1.5 Tumor-assoziierte Antigene

Entartete Tumorzellen können eine Vielzahl von Proteinen aufweisen, die in ihrer Struktur stark verändert oder überexprimiert sind und in Form von Peptiden auf den MHC Komplexen der Tumorzelle präsentiert werden (Rosenberg 2001). Solche sogenannten Tumor-assoziierten Antigene stellen potentielle Zielstrukturen spezifischer autologer T-Zellen dar. Beispielsweise können Tumorantigen-spezifische T-Zellen mit Hilfe von Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen zu Effektor-T-Zellen mit dem Potential zur Tumorabstoßung aktiviert werden. TAAs können folgende Hauptkategorien unterteilt werden (rezensiert in Renkvist et al. 2001, Rosenberg 2001, Janeway and Travers 2001): 1) *Gewebsspezifische Differenzierungs-Antigene*, wie z.B. MART-1/Melan-A, gp100 und Tyrosinase, die ausschließlich von differenzierten Zellen eines Gewebetyps exprimiert werden; 2) *Krebs-Testis-Antigene*, wie z.B. MAGE, BAGE, GAGE und NY-ESO-1, die von Testis, Plazenta und verschiedenen Tumoren exprimiert werden; 3) *Mutierte Antigene*, wie z.B. Caspase-8, CDK-4 und β -Catenin, die individuell exprimiert werden können; 4) *Überexprimierte Antigene*, wie z.B. Her-2/neu, MUC-1, CEA, Telomerase und α -

Fetoprotein, deren Expression in Tumorzellen höher ist als in normalen Zellen; 5) *Modifizierte Antigene*, wie z.B. MUC-1, mit anormaler posttranslationaler Modifizierung; 6) *Virale Antigene*, wie z.B. HPV Typ 16, E6 und E7 Proteine, die z.B. beim Cervix-Karzinom vorkommen.

MUC-1

Das Genprodukt des MUC-1 Gens, Mucin, ist ein glykosyliertes Typ I transmembranes Glykoprotein, dass auf der luminalen/apikalen Oberfläche von normalen Epithelien exprimiert wird. MUC-1 kann jedoch in veränderter, unterglykosylierter Form als TAA dienen. Eine Überexpression von MUC-1 kommt neben der Laktation bei einer Vielzahl von Adenokarzinomen, wie z.B. dem Mammakarzinom und Ovarialkarzinom (Gendler et al. 1988, Siddiqui et al. 1988, Girling et al. 1989), sowie bei einigen hämatologischen Tumoren, wie dem Multiplen Myelom und einigen B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen vor (Duperray et al. 1989, Mark and Mangkornkanok 1989, Apostolopoulos and McKenzie 1994, Finn et al. 1995, Brossart et al. 2001). Des weiteren weist Krebs-assoziiertes Mucin eine geringere O-Glykosylierung von Serin- und Threonin-Resten des MUC-1 Kernproteins als in nicht-neoplastischen Zellen auf (Burchell and Taylor-Papadimitriou 1993, Lloyd et al. 1996). Die Kohlenhydrat-Seitenketten von MUC-1 Mucin sind kürzer oder weniger dicht verteilt als bei normalen Zellen (Matsukita et al. 2003). Die verschiedenen Glykoformen können somit strukturell andersartige T-Zell-Epitope darstellen.

Die Struktur des Kernproteins von MUC-1 Mucin enthält eine große extrazelluläre Domäne, die 25-125 „tandem repeats“ von 20 Aminosäuren enthält und reich an Serin und Threonin ist (Taylor-Papadimitriou et al. 2002). Zytotoxische T-Zellen können sowohl in einer MHC-restringierten (Apostolopoulos et al. 1995, Domenech et al. 1995) als auch in einer nicht-MHC-restringierten (Barnd et al. 1989, Takashi et al. 1994) Art und Weise, Epitope des MUC-1 Proteins erkennen. Kürzlich wurden zwei Peptide in der Aminosäuresequenz von MUC-1 identifiziert, die eine starke Bindung an das HLA-A2 Molekül aufweisen. Eines stammt aus der „Tandem Repeat“ Region (STAPPAHGV), das zweite ist in der Signalsequenz des MUC-1 Proteins lokalisiert (LLLLTVLTV) (Brossart et al. 1999).

Eine Expression von MUC-1 in Krebspatienten ist oft mit einem hohen metastatischen Potential und einer schlechten Prognose verbunden (Kabayashi et al. 1992, Fung and Longenecker 1991).

Es gibt viele Hinweise darauf, dass MUC-1 ein guter Kandidat für adoptive Immuntherapien gegen humane Krebserkrankungen ist (Akagi et al. 1997, Karanikas et al. 1997, Samuel et al. 1998, Acres et al. 2000, Wright et al. 2000, Kontani et al. 2000).

Her-2/neu

Das onkogene Protein Her-2/neu (ErbB2/neu) ist ein TAA aus der Epidermalen Wachstums-Rezeptor (EGFR) Familie (Yamamoto et al. 1986) und weist eine 50% Homologie zum EGFR auf (Schechter et al. 1984, Bargmann et al. 1986). Zur Familie gehören insgesamt vier Rezeptor-Tyrosinkinasen, die Wachstumsfaktoren in Form von Dimeren binden und Wachstum, Differenzierung und Überleben von Zellen vermitteln.

Her-2/neu wird im Menschen während der fötalen Entwicklung exprimiert (Press et al. 1990) und ist beim gesunden Erwachsenen nur noch schwach auf Epithelzellen einiger normaler Gewebe zu detektieren. Das Her-2/neu Gen ist in normalen Zellen nur als einzelne Kopie vorhanden (Press et al. 1990).

Eine Überexpression von Her-2/neu ist in 20 – 30% aller Brustkrebs-Patienten zu finden sowie in anderen Adenokarzinomen wie Ovarial-, Kolorektal- oder renalen Zellkarzinomen (Slamon et al. 1989, Wang and Hung 2001) und hämatologischen Erkrankungen wie ALL (akute-lymphoblastische-Leukämie) (Bühning et al. 1995). In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Her-2/neu mit der onkogenen Transformation und dem metastatischen Potential von Tumorzellen sowie einer schlechten Prognose korreliert (Slamon et al. 1989, Wang and Hung 2001). Eine Überexpression von Her-2/neu, das v.a. durch Genamplifikation zustande kommt, ist assoziiert mit einer Dosis-abhängigen Erhöhung des Zellwachstums (Slamon 2000, Slamon 1999).

Das Her-2/neu Protein stellt in vielen Studien ein vielversprechendes therapeutisches Ziel für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien unter Verwendung monoklonaler Antikörper oder Tyrosinkinase-Inhibitoren dar (Wang and Hung 2001, Yip and Ward 2002, Moasser et al. 2001, Sawyers 2002). So konnten Antikörper-, T-Helfer- sowie zytotoxische T-Lymphozyten-vermittelte Her-2/neu-spezifische Immunantworten in Patienten Brust-, Ovarial-, Kolon- und anderen Krebserkrankungen detektiert werden (Disis and Schiffman 2001).

1.6 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der funktionalen und phänotypischen Charakterisierung Tumor-spezifischer T-Zellen mit einem Schwerpunkt auf Gedächtnis T-Zellen.

Es wurden folgende Punkte untersucht:

1. Das Vorkommen Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen in Blut und Knochenmark von Patienten mit Multiplen Myelom und ihre Fähigkeit zur Induktion einer Anti-Tumor Immunantwort.
2. Phänotypische und funktionale Unterschiede zwischen Tumor-spezifischen T-Zellen aus dem Blut oder Knochenmark T-Zellen von Patientinnen mit Mammakarzinom und deren Korrelation mit dem Zytokinmilieu der Tumor-Mikroumgebung.
3. Die Kapazität verschiedener T-Gedächtniszell Subpopulationen zur Proliferation, Effektorfunktion und Apoptoseresistenz.

Diese Arbeit wurde durch die Bereitstellung von klinischem Material von Patienten mit primärem Mammakarzinom und Multiplem Myelom durch die Universität-Frauenklinik und der Medizinischen Klinik der Universität Heidelberg ermöglicht.

2 Material

2.1 Geräte

Brutschrank	Nuaire, Plymouth, USA
Dispergiergerät Ultra-Turrax®	IKA-Werke, Staufen, D
ELISA-Meßgerät	Labsystems, Helsinki, FI
ELISpot-Mikroskop Axioplan 2 imaging	Zeiss, Oberkochen, D
Eppendorff-Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, D
FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg, D
FACSVantage	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Gamma-Counter	Wallac, Turku, FI
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Gefrierschrank -70°C Bio Freeze®	Forma Scientific, USA
Glasgeräte	Schott, Mainz, D
Glaspipetten	Hirschmann, Eberstadt, D
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, D
Laborzentrifuge Minifuge	Heraeus, Hanau, D
Magnetheizrührer	Heidolph, Heidelberg, D
MidiMACS Separations-Einheit	Miltenyi Biotec, Hamburg, D
Mikroskop Diavert	Leitz, Wetzlar, D
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, D
Milli-Q-Wasserreinigungssystem	Millipore, Eschborn, D
MPC-L (magnet particle concentrator-large; für 6x 15ml Röhrchen)	Dynal, Hamburg, D
Multikanalpipette (8 Kanäle)	Rainin, Leiden, NL
Neubauer Zählkammer (0,100 mm Tiefe)	Brand, Wertheim, D
OctoMACS & MidiMACS Separationseinheit	Miltenyi Biotec, Hamburg, D
pH-Meßgerät	WTW, Weilheim i. OB, D
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Göttingen, D
Pipetten 2-1000 µl automatisch	Gilson, Bad Camberg, D
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, Wertheim, D
Präparierbesteck	Dumont, CH
Schüttler HS 501 digital	IKA Labortechnik, Staufen, D
Spektrophotometer Titertek Multiscan Plus MK I I	Laborsystems, Helsinki, FI
Sterilwerkbank SterilGARD Hood	Baker, Sanford, Maine, USA

Vortex Reax 2000

Heidolph, Schwabach, D

Waage

Sartorius, Göttingen, D

Wasserbad

Julabo, Seelbach, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Amprep C18-Minisäulen, 100 mg

Amersham Biosciences, Freiburg, D

Combitips

Eppendorf, Hamburg, D

Counter-Röhrchen

Greiner, Frickenhausen, D

Deckgläser

Langenbrick, Emmendingen, D

Einfrierröhrchen

Corning B.V., Schiphol-Rijk, NL

Einmalkanülen 20G, 25G, 27G

BD Biosciences, Heidelberg, D

Einmalkanülen 1,20x100 m/m

TSK-SUPRA, Geislingen, D

Einmalpipetten

Renner, Dannstadt, D

Einmalskalpelle

PfM Ag, Köln, D

Einmalspritzen 1 ml

Henke Sass Wolf, Tutlingen, D

Einmalspritzen 10-50 ml

BD Discardit II, Heidelberg, D

ELISA-Platten, flexibel

BD Biosciences, Heidelberg, D

ELISpot-Klebefolien

Millipore, Eschborn, D

(tape multiscreen harvester plate)

Eppendorf-Röhrchen 0,5; 1,5 und 2 ml

Eppendorf, Köln, D

FACS-Röhrchen

Greiner, Frickenhausen, D

Mikroskopgläser

Langenbrick, Emmendingen, D

Parafilm

American National Can, USA

Pipetten 2, 10, 200, 1000 µl

Gilson, Bad Camberg, D

Pipettenspitzen

Starlab, Ahrensburg, D

Röhrchen mit Filterscheibe Leucosep® 50 ml

Greiner, Frickenhausen, D

Rundboden-Röhrchen 5 ml

Greiner, Frickenhausen, D

Separationssäulen MS⁺, LS⁺

Miltényi Biotec, Hamburg, D

Sterilfilter 0,22 µm

Millipore, Molsheim, F

Zellkulturflaschen 25, 75 und 150 cm³

TPP, Trasadingen, CH

Zellkulturschalen 6x15 mm und 100x20 mm

TPP, Trasadingen, CH

Zellkulturschalen 145x20 mm

Greiner, Frickenhausen, D

Zellschaber

TPP, Trasadingen, CH

Zellsieb 40 µm

Falcon BD, Heidelberg, D

Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml

Biochrom, Berlin, D

6-, 24-, 48- und 96-Loch Flachbodenplatten

Falcon BD, Heidelberg, D

(nicht für Gewebekultur behandelt)

6- und 12-Loch Flachbodenplatten

TPP, Trasadingen, CH

(zellkulturbehandelt)

24-, 48- und 96-Loch Flachbodenplatten

Greiner, Frickenhausen, D

(zellkulturbehandelt)

96-Loch Rundbodenplatten

Biochrom, Berlin, D

(zellkulturbehandelt)

96-Loch-Platte für ELISpot

Millipore, Molsheim, D

(0,45 µm cellulose-ester membrane)

2.3 Chemikalien

Aceton

Riedl-de Haën, Seelze, D

AEC-Chromogen

Merck, Darmstadt, D

Antikörperverdünnungspuffer

Dako, Hamburg, D

AP Konjugat-Substrat-Kit

Bio-Rad, München, D

BCIP/NBT Substrat

Dako, Hamburg, D

Biocoll Trennlösung

Biochrom, Berlin, D

Bio-Rad Proteinassay Lösung

Bio-Rad, München, D

BSA (Rinderserumalbumin)

Sigma, Deisenhofen, D

Chloroform

Merck, Darmstadt, D

Cytofix-Cytoperm™-Kit:

Pharmingen, Heidelberg, D

Cytofix-Cytoperm™

Perm/Wash Buffer™

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Darmstadt, D

EDTA

Biochrom, Berlin, D

Endobulin

Baxter, Unterschleißheim, D

Essigsäure, 100%

Merck, Darmstadt, D

Essigsäureethylester

Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D

Ethanol, p.a.

Riedl-de Haën, Seelze, D

Formaldehyd, 37 %

Merck, Darmstadt, D

GolgiPlug™

BD Pharmingen, Heidelberg, D

GolgiStop™

BD Pharmingen, Heidelberg, D

Harnstoff

Fluka, Buchs, CH

Heparin-Natrium

B.Braun, Melsungen, D

Isopropanol

Riedl-de Haën, Seelze, D

Kaiser's Glycerolgelatine	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4	Merck, Darmstadt, D
n-Hexan	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchloridpulver	J.T. Baker, Deventer, NL
Natriumchromat $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$	NEN, Bad Homburg, D
Natriumdihydrogenphosphat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natronlauge, 10 N	Riedl-de Haën, Seelze, D
MEM-nichtessentielle Aminosäurelösung (ne-AS)	Sigma, Deisenhofen, D
Paraffin-Wachs	Vogel, Medizinische Technik & Elektronik, Gießen, D
PBS-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Peroxidase	Dako, Hamburg, D
Propidiumjodid	Sigma, Deisenhofen, D
Salzsäure 1N	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure 95-97%	Merck, Darmstadt, D
TMB-Microwell Peroxidase Substrat System	KPL, Maryland, USA
Trypanblaupulver	Serva, Heidelberg, D
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin, D
Tween 20	Gerbu Biotechnik, Gaiberg, D
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, D

2.4 Zellen

2.4.1 Humane Primärzellen

Mononukleäre Zellen (MNZ) aus peripherem Blut (PBMZ)

Isolierung der MNZ aus Blut und Knochenmarkblut von gesunden Spendern und Patienten mit Brustkrebs oder Multiplem Myelom.

Dendritische Zellen (DZ)

Isolierung adhärenter MNZ aus dem peripheren Blut und Knochenmarkblut von gesunden Spendern und Patienten mit Brustkrebs oder Multiplem Myelom. Differenzierung adhärenter Monozyten zu DZ in einer 7-Tage-Kultur in DZ-Medium versetzt mit IL-4 und GM-CSF.

T-Zellen (TZ)

Isolierung nichtadhärenter MNZ aus dem peripheren Blut und Knochenmarkblut von gesunden Spendern und Patienten mit Brustkrebs oder Multiplem Myelom. Kultivierung der T-Zellen in einer 7-Tage-Kultur in TZ-Medium versetzt mit IL-2 und IL-4.

2.4.2 Etablierte humane Zelllinien

K562	Myeloide Leukämielinie, NK-sensitiv (HLA-A2/-), (Lozzio 1975 und 1979)
MCF-7	Mammakarzinomlinie (HLA-A2/-, B18/44, Cw0501/-), (Soule 1973)
U-266	Multiple Myelomlinie, DSMZ, Braunschweig, (Nilsson 1970)
U937	Promonozytäre Leukämielinie (HLA-A3/31, B18/51, Cw0501/-), (Nilsson und Sundstrom 1974)
T2	mutierte Variante von T1-Zellen, einem Hybrid zwischen der mutierten Zelllinie 721.174 (exprimiert HLA-A2 in reduzierter Form und weist eine fast vollständige Deletion der MHC Klasse II Region inkl. TAP und Proteasomgene auf) und der T-Lymphoblasten Zelllinie CEM. T2-Zellen exprimieren HLA-A2 zu 30-50% des Wertes von T1-Zellen (174xCEM, T2 Hybridom, TAP-1 und -2 defizient, HLA-A2/-, B51/-, Cw01/-) (Salter 1985, Wei and Cresswell 1992)

2.5 Medien und Mediensupplemente

DMEM/F12-Pulver	Sigma Deisenhofen, D
Erythrocin	Abott, Wiesbaden, D
FCS	Biochrom, Berlin, D
Geneticin® (G418 Sulfat)	Life Technologies, Karlsruhe, D
Gentamycin	Biochrom, Berlin, D
Glutamin	Biochrom, Berlin, D
HEPES	Biochrom, Berlin, D
Humanes AB-Serum	Sigma, Deisenhofen, D
Penicillin/Streptomycin	Pan™ Biotech, Aidenbach, D
RPMI 1640-Pulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Vancomycin	Abott, Wiesbaden, D
X-vivo 20, Serum-frei	BioWhittaker, Vervier, B
Zienam	MSD Sharp & Dohme, Haar, D

2.6 Zytokine

Rekombinantes GM-CSF	ESSEX PHARMA, München, D
Rekombinantes humanes IL-2	PromoCell, Heidelberg, D
Rekombinantes humanes IL-4	PromoCell, Heidelberg, D
Rekombinantes IL-7	PromoCell, Heidelberg, D
Rekombinantes IL-15	PromoCell, Heidelberg, D
Rekombinantes TGF-β1	PromoCell, Heidelberg, D

2.7 Antikörper, ELISpot und ELISA-Kits

2.7.1 Nicht-konjugierte und Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Antikörper

Name	Spezies	Isotyp	Klon	Referenz oder Firma
anti-Apo2.7-PC5	Maus	IgG1	2.7A6A3	Beckman Coulter, Krefeld, D
anti-CA 15-3	Maus	IgG1	DF3	Dako, Hamburg, D
anti-CCR7	Maus	IgM	2H4	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CCR7-Biotin	Rat	IgG2a	3D12	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD3	Maus	IgG1	OKT-3	Dr. Haas, DKFZ, Heidelberg, D
anti-CD4-APC	Maus	IgG2a	S3.5	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD4-APC-Cy7	Maus	IgG2a	S3.5	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD4-Cy-Chrome	Maus	IgG1	RPA-T4	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD4-FITC	Maus	IgG1	RPA-T4	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD4-PE	Maus	IgG1	RPA-T4	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD4-PE-Cy7	Maus	IgG2a	S3.5	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD8	Maus	IgG1	DK25	Dako, Hamburg, D
anti-CD8-APC	Maus	IgG2a	3B5	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD8-APC-Cy7	Maus	IgG2a	3B5	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD8-Cy-Chrome	Maus	IgG1	HIT8a	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD8-FITC	Maus	IgG1	HIT8a	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD8-PE	Maus	IgG1	HIT8a	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD8-PE-Cy7	Maus	IgG2a	3B5	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD28	Maus	IgG1	15E8	Dr. Haas, DKFZ, Heidelberg, D
anti-CD45RA-APC	Maus	IgG2b	MEM 56	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD45RA-FITC	Maus	IgG2b	HI100	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD45RA-PE	Maus	IgG2b	HI100	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-CD56	Maus	IgG1	C218	Beckman Coulter, Krefeld, D
anti-CD62L-APC-Cy7	Maus	IgG1	DREG-56	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-CD62L-PE	Maus	IgG1	DREG-56	Caltag Lab., Hamburg, D
anti-HLA-A2 (Zellkultur-Überstand)	Maus	IgG2b	BB7.2	Dr. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg, D
anti-IFN- γ -FITC	Maus	IgG1	4S.B3	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-IFN- γ -PE	Maus	IgG1	4S.B3	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-IL4-FITC	Ratte	IgG1	MP4-25D2	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-IL10-PE	Ratte	IgG1	JES3-9D7	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-Perforin-FITC	Maus	IgG2b	δ G9	BD Pharmingen, Hamburg, D
anti-Perforin-PE	Maus	IgG2b	δ G9	BD Pharmingen, Hamburg, D

2.7.2 Isotypen-Kontrolle, Zweit- und Dritt-Antikörper

Maus-IgG1-PC5, Isotype-Kontrolle	Beckman Coulter, Krefeld, D
Maus-IgG1-FITC, Isotypen-Kontrolle	BD Pharmingen, Hamburg, D
Maus-IgG1-PE, Isotypen-Kontrolle	BD Pharmingen, Hamburg, D
Ratte-IgG1-FITC, Isotypen-Kontrolle	BD Pharmingen, Hamburg, D
Ratte-IgG1-PE, Isotypen-Kontrolle	BD Pharmingen, Hamburg, D
Ratte-IgG2a-Biotin, Isotypen-Kontrolle	BD Pharmingen, Hamburg, D
Ratte-anti-Maus-IgM-Biotin	BD Pharmingen, Hamburg, D
Ziege-anti-Maus-IgG-FITC	Dianova, Hamburg, D
Ziege-anti-Maus-alkalische Phosphatase	Dako, Hamburg, D
Ziege-anti-Maus-Peroxidase	Dako, Hamburg, D
Streptavidin-APC-Cy7	BD Pharmingen, Hamburg, D
Streptavidin-PECy7	Caltag, Lab., Hamburg, D

Annexin V-FITC Kit:

Annexin V-FITC	Beckman Coulter, Krefeld, D
Annexin V-Bindungspuffer	
Propidiumjodid (PI)	

IFN- γ Secretion Assay – Detektions-Kit:

anti-IFN- γ Antikörper (Catch Reagent)	Miltenyi Biotec, Hamburg, D
anti-IFN- γ Detektions-Antikörper, R-PE konjugiert	

2.7.3 Dynabeads®

Dynabeads® M-450 CD3	Dynal, Hamburg, D
Dynabeads® M-450 CD15	Dynal, Hamburg, D
Dynabeads® M-450 CD19	Dynal, Hamburg, D
Dynabeads® Pan Mouse IgG	Dynal, Hamburg, D

2.7.4 MACS® MicroBeads

CD45RA MicroBeads

Miltenyi Biotec, Hamburg, D

CD45RO MicroBeads

Miltenyi Biotec, Hamburg, D

2.7.5 ELISpot-Kits

Maus-anti-Human-IFN- γ

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IFN- γ -Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL4

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL4-Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL10

Mabtech, Hamburg, D

Maus-anti-Human-IL10-Biotin

Mabtech, Hamburg, D

Streptavidin-AP

Mabtech, Hamburg, D

AP-Farbentwicklungspuffer

Bio-Rad, München, D

AP-Farbreagenz A

Bio-Rad, München, D

AP-Farbreagenz B

Bio-Rad, München, D

2.7.6 ELISA-Kits

OptEIA™ Human IFN- γ Set

BD Pharmingen, Hamburg, D

OptEIA™ Human IL-4 Set

BD Pharmingen, Hamburg, D

OptEIA™ Human IL-10 Set

BD Pharmingen, Hamburg, D

Quantikine® Human IFN- γ Immunoassay

R & D Systems, Wiesbaden, D

Quantikine® Human IL-4 HS Immunoassay

R & D Systems, Wiesbaden, D

Quantikine® Human IL-10 HS Immunoassay

R & D Systems, Wiesbaden, D

Quantikine® Human TGF- β Immunoassay

R & D Systems, Wiesbaden, D

Prostaglandin E₂ HS Immunoassay

R & D Systems, Wiesbaden, D

2.8 Proteine, Peptide und Tetramere

Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)

Sigma, Deisenhofen, D

Tetanus Toxoid

Merck Biosciences, Schwalbach, D

Tetanol® pur

Chiron Behring, Marburg/Lahn, D

Protein A	Sigma, Deisenhofen, D
HLVEALYLV, Insulin-Peptid, 34-42	Abteilung Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
LLLLTVLTV, MUC 1-Peptid, 12-20	Abteilung Peptidsynthese, DKFZ, Heidelberg, D
HLA-A*0201- KIFGSLAFL Tetramer, R-PE konjugiert	NIAID Tetramer Facility and NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, USA
HLA-A*0201- LLLLLTVLTV Tetramer, R-PE konjugiert	NIAID Tetramer Facility and NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, USA
HLA-A*0201- SLYNTVATL Tetramer, R-PE konjugiert	NIAID Tetramer Facility and NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, USA

2.9 Tiere

Sechs bis zwölf Wochen alte, weibliche NOD/Scid (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) Mäuse wurden von der Firma Charles River Wiga (Sulzfeld, D) bezogen. Die Tierhaltung erfolgte unter keimfreien Bedingungen in der Barriere III des Zentralen Tierlabors des Deutschen Krebsforschungszentrums.

2.10 Zusätzliche Software

CELLQuest	BD Biosciences, Heidelberg, D
FlowJo (FACScan Software)	Tree Star Inc., San Carlo, USA
KS ELISpot	Zeiss, Göttingen, D

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Lösungen und Puffer

1x PBS

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaH ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O	2,85 g

in 1l ddH₂O lösen, pH 7,2, Lagerung bei 4°C

Trypsin-EDTA

10x Trypsin-EDTA + 1x PBS, Lagerung bei 4°C

Trypanblau-Färbelösung

Trypanblau	1,28 g
NaCl	8,5g

in 1l ddH₂O lösen, steril filtrieren, mit Natriumazid (NaN₃-Endkonzentration 1%) versetzen und bei Raumtemperatur lagern.

3.1.2 Medien und Mediensupplemente

Dendritische Zellen wurden in X-vivo kultiviert, das mit Zytokinen versetzt wurde. Im Folgenden nur noch als „Dendritenmedium“ bezeichnet:

X-vivo 20	10 ml
HEPES	10 mM
Penicillin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
GM-CSF	560 Einheiten/ml
IL-4	1000 Einheiten/ml

Zur Herstellung von Kulturmedium für T-Zellen wurde zunächst RPMI 1640 mit folgenden Zusätzen versetzt, im Folgenden nur noch als „RPMI-Medium“ bezeichnet:

RPMI 1640	10 ml
HEPES	10 mM
Penicillin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml

„RPMI-Medium“ wurde nachfolgend mit 8% (v/v) humanem AB-Serum und Zytokinen versetzt. Im Folgenden nur noch als „T-Zellmedium“ genannt:

RPMI komplett	10 ml
AB Serum	800 µl
IL-2	100 Einheiten/ ml
IL-4	60 Einheiten/ml

Als Kulturmedium für die Tumorzelllinien SK-MEL 23, U-266, U937 und T2 wurde RPMI 1640-Zellkulturmedium mit 10 % (v/v) FKS verwendet. Im Folgenden nur noch als „Medium+10% FKS“ bezeichnet:

RPMI 1640	450 ml
HEPES	10 mM
Penicillin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
FKS	50 ml

Das FKS wurde für 60 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert und bei -20°C aufbewahrt.

Die Tumorzelllinie MCF-7 wurde in DMEM/F12 Medium mit 10% (v/v) FKS kultiviert. Das Medium DMEM/F12 wurde als Pulver in entsprechender Menge Milli-Q-Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1M Natronlauge auf 7,4 eingestellt, mit 5% CO₂/95% Druckluft begast und sterilfiltriert. Im Anschluß wurde das DMEM/F12 Medium mit Zusätzen versetzt, im Folgenden nur noch als „10% DMEM/F12-Medium“ bezeichnet:

L-Glutamin	4,5 mM
HEPES	10 mM
Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	100 µg/ml

ne-AS-Lösung	1x
FKS	10 % (v/v)

Die Tumorzelllinie K562 wurde in X-vivo 20 und Geneticin-G418 (1 µg/ml) kultiviert.

3.1.3 Kultivierung von Zellen

3.1.3.1 Zellkulturbedingungen

Alle Inkubationen und Kultivierungen von Zelllinien wurden bei 37°C in einem Begasungsbrutschrank mit 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

Gearbeitet wurde stets unter einer Sterilwerkbank mit Lüftung. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte, falls nicht anders aufgeführt, für 5 Minuten bei 1400 Umdrehungen.

3.1.3.2 Kultivierung von humanen Primärzellen

Dendritische Zellen und T-Zellen sind Suspensionszellen. Beide wurden in Petrischalen kultiviert und dreimal in der Woche mit frischem Dendriten- und T-Zellmedium versorgt. Die Hälfte des Mediums wurde abgenommen, zentrifugiert und enthaltene Zellen in neuem Medium resuspendiert. Diese wurden dann zur Kultur zurückgegeben.

3.1.3.3 Kultivierung von Tumorzellen

Die in Suspension wachsenden Tumorzelllinien K562, U937, U-266 und T2 wurden in Zellkulturflaschen kultiviert und 1-2 Mal in der Woche, je nach Zelldichte, passagiert. Dabei wurden ca. 1/3 der Zellsuspension der Flasche entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die entnommene Zellsuspension wurde verworfen.

Die Tumorzelllinie MCF-7 wächst adhärent in multilamellaren Schichten und wurde ebenfalls in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1-2 Minuten mit Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium abgespült, zentrifugiert und mit einer Verdünnung 1:2 passagiert.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 400 µl Zellsuspension (4×10^5 - 2×10^7 Zellen/ml) in 500 µl Serum und 100 µl DMSO (Endkonzentration DMSO: 10%) bei -70°C eingefroren. Nach ca. 24 Std. wurden die Röhrchen bei -200°C in flüssigen Stickstoff überführt und aufbewahrt.

Zum Auftauen von Zellen wurde warmes Medium (37°C) mit einer Pasteurpipette zu den gefrorenen Zellen gegeben, um ein schnelles Auftauen und eine rasche Verdünnung des zelltoxischen DMSOs zu gewährleisten. Die Zellen wurden zweimal gewaschen und anschließend in Kulturflaschen oder Petrischalen ausgesät.

3.1.5 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Trypanblau ermöglicht die Differenzierung zwischen vitalen und nicht-vitalen Zellen, da es nicht-vitale Zellen mit defekter Plasmamembran anfärbt.

Die genaue Zellzahl wurde bestimmt, indem ein Teil der Zellen mit Trypanblau in der gewünschten Verdünnung (meist 1:10) angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt wurde. Gezählt wurden 4 Großquadrate, um die Zellzahl pro ml zu bestimmen. Der Zelltiter berechnet sich nach der folgenden allgemeinen Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellen} \div \text{Anzahl ausgezählte Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$$

Die allgemeine Vitalität der Zellen berechnet sich nach folgender Formel:

$$\% \text{ Zell-Vitalität} = \text{vitale Zellen (ungefärbt)} \div \text{Zellen (gefärbt und ungefärbt)} \times 100$$

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Lysaten

3.2.1.1 Herstellung von Gewebelysaten

Solide Tumore, axilläre Haut, Drüsengewebe und Lymphknoten (metastasiert und nicht-metastasiert) aus der UFK wurden nach der Entnahme in „RPMI-Medium“ bei -20°C eingefroren.

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Gewebe aufgetaut und unter sterilen Bedingungen mit PBS in einer Zellkulturschale gewaschen. Mit Hilfe eines Einmalskalpells wurde, wenn vorhanden, anhaftendes Fettgewebe entfernt und das Gewebe zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in ein 5 ml Röhrchen mit 500 µl PBS überführt und anschließend mittels eines Dispergiergeräts homogenisiert. Um eine Kontamination der verschiedenen Gewebelysate zu vermeiden, wurde das Dispergier-Messer vor und nach jeder Benutzung mind. dreimal mit 0,2 N Natronlauge und anschließend sechs- bis achtmal mit ddH₂O gespült.

Die Gewebesuspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgegossen und für 30 Minuten, bei 13.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, sterilfiltriert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt (siehe 2.2). und das Gewebelysat anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.1.2 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Herstellung von Zell-Lysaten aus humanen Primär-T-Zellen oder etablierten Tumorzelllinien wie MCF-7, U937 und U-266 wurden die entsprechenden Zellen zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das Zellsediment wurde je nach Größe in 50-100 µl PBS aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Durch fünfmaliges, abwechselndes Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37°C wurde eine vollständige Lyse der Zellen erreicht. Das Lysat wurde anschließend für 30 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt (siehe 2.2). Das Zelllysate wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der hergestellten Lysate wurde mit der „Bradford“-Methode (Bradford et al. 1976) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue von 465 nm zu 595 nm durch nicht-kovalente Bindung an Protein in saurer Lösung; die Absorption bei 595 nm verhält sich dabei direkt proportional zur enthaltenen Proteinmenge. Eine Eichkurve zur Bestimmung unbekannter Proteinkonzentrationen wurde mit Hilfe von Standard-Proteinlösungen bekannter Rinderserumalbumin-Konzentrationen (0,1 - 1,4 mg/ml) erstellt. Die Farblösung „BioRad®-Protein Assay“ wurde 1:5 mit ddH₂O verdünnt und 200 µl davon mit 5 µl der unbekannten Proben bzw. der bekannten Standard-Proteinlösungen in Duplikaten pipettiert. Nach 5 Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Die Eichkurve wurde mit dem Computerprogramm „Graph Pad Prism“ erstellt und daraus die Konzentration der Proben berechnet.

3.2.3 Lösen von Peptiden

Die von der Peptidsyntheseabteilung des Deutschen Krebsforschungszentrums synthetisierten Peptide lagen zunächst als Pulver vor und wurden vor ihrem Gebrauch auf 1 mg/ml in Medium mit 10 % DMSO eingestellt. 1 mg Peptid wurde steril abgewogen und in 100 µl DMSO gelöst. Im Anschluß wurden 900 µl X-vivo 20 tröpfchenweise zugegeben. Im Falle einer Ausfällung des Peptids, wurde für ca. 15 Minuten im Ultraschallbad inkubiert, bevor die restliche Mediummenge pipettiert wurde. 10 µl-Portionen der Peptidlösung wurden bei -20°C gelagert.

3.3 Immunbiologische Methoden

3.3.1 Lösungen und Medien

5% AB Medium

RPMI komplett	475 ml
Humanes AB Serum	25 ml

3% AB Medium

RPMI komplett	485 ml
Humanes AB Serum	15 ml

ELISpot Beschichtungs-Puffer

Bikarbonat	2,93 g
Karbonat	1,59 g

auf 1l mit ddH₂O, steril filtrieren, Lagerung der portionierten Lösung bei -20°C, einmonatige Lagerung der aufgetauten Lösung bei 4°C

ELISpot-Waschpuffer

1x PBS	500 ml
Tween 20	0,25 %

ELISpot-Substratlösung

Bidest Wasser	10 ml
25x Substratpuffer	400 µl
Substrateagenz A	100 µl
Substrateagenz B	100 µl

FACS Puffer

1x PBS	50 ml
FKS	1 %

MACS Puffer

1x PBS	500 ml
BSA	0,5%
EDTA	2 mM
steril filtrieren, Lagerung bei 4°C	

3.3.2 Organisches Material von Patienten und gesunden Spendern

Peripheres Blut und Knochenmark-Blut von Patienten mit Mammakarzinom bzw. Plasmozytom oder von gesunden Spendern sowie Tumor, Haut, Lymphknoten, Drüsengewebe bzw. Knochenmark-Stanzen von Krebspatienten wurden nach einer schriftlichen Aufklärung mit nachfolgender Einwilligung in der Universitäts-Frauenklinik bzw. Medizinischen Klinik der Universität Heidelberg D., entnommen. Das Knochenmark-Blut wurde aus dem Beckenkamm unter systemischer bzw. lokaler Anästhesie abgenommen. Heparanisiertes Knochenmark- sowie peripheres Blut wurde sofort einer Ficoll-Gradientenzentrifugation unterworfen und isolierte mononukleäre Zellen in Kultur genommen. Gewebe wurde dagegen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bzw. -70 °C aufbewahrt.

3.3.3 Isolierung und Kultivierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark

Humane MNZ aus peripherem Blut sowie aus Knochenmark-Blut wurden mit einer Dichtezentrifugation über einen Ficoll-Stufengradienten (Dichte 1,077 g/ml) isoliert. Sie setzen sich vorwiegend aus Lymphozyten und Monozyten zusammen. Unter der Abtrennung von Erythrozyten und polymorphonukleären Leukozyten, reichern sich die MNZ aufgrund ihrer geringeren Dichte an der Phasengrenze an. Die oberste Phase enthält das Plasma.

15 ml Ficoll-Lösung wurde in ein Leucosep-Röhrchen vorgegeben und für 1 Minute bei 1000 UpM zentrifugiert, damit die Lösung durch den Separationsfilter sedimentiert. Das periphere Blut bzw. Knochenmark-Blut wurde 1:2 mit RPMI 1640 verdünnt, auf das Röhrchen gegeben und für 20 Minuten bei 2000 UpM mit Bremse zentrifugiert. Falls das Knochenmarkblut Klumpen enthielt, wurde es nicht in Leucosep-Röhrchen, sondern in 50ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und vorsichtig mit 15 ml Ficoll-Lösung unterschichtet

und wie oben beschrieben aber ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 10-14 ml autologes Plasma abgenommen und in der Interphase befindlichen MNZ mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit X-vivo 20 gewaschen und je nach Größe des Zellsediments auf eine beschichtete Zellkulturplatte oder Petrischale ausplattiert und für mindestens 2 Stunden bis zu 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Isolierung erfolgte bei einer Zelldichte von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml. Monozyten adhären an die Plastikoberfläche, Lymphozyten jedoch nicht und verbleiben im Überstand. Nach der Inkubationszeit wurden die nicht-adhärenen Lymphozyten abgenommen und die Platte einmal vorsichtig mit X-vivo gespült, um möglichst alle nicht-adhärenen Zellen zu entfernen. Adhärenente Zellen wurden mit „Dendritenmedium“ eine Woche lang im Brutschrank kultiviert, um aus ihnen Dendritische Zellen zu generieren. Die im Überstand befindlichen Lymphozyten wurden zentrifugiert, das Zellsediment in „T-Zellmedium“ aufgenommen und je nach Zellzahl in eine nicht-beschichtete Zellkulturschale oder Petrischale mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und ebenfalls eine Woche lang kultiviert.

3.3.4 Isolierung spezifischer Immunzell-Populationen über Zelloberflächenmoleküle

3.3.4.1 Isolierung von Lymphozyten mit Hilfe der magnetischen Separation über Dynabeads®

Dynabeads® sind superparamagnetische, monodisperse Polystyrol-Beads und haben eine gleichmäßige Dispersion von magnetischem Material aus $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ und Fe_3O_4 . Die Bead-Oberfläche ist mit Antikörpern überzogen, die sowohl gegen bestimmte Zelloberflächenantigene als auch gegen Immunglobuline gerichtet sein können. Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften lassen sich in einem starken Magnetfeld die an Beads geheftete Zellen von den übrigen Zellen abtrennen. Auf diese Weise können bestimmte Zell-Populationen depletiert bzw. isoliert werden.

3.3.4.1.1 Anreicherung von T-Lymphozyten mit Dynabeads®

T-Lymphozyten aus T-Zell-Kulturen aus peripherem Blut oder Knochenmark-Blut stammend (siehe 3.3) wurden stets über Dynabeads® angereichert, indem Natural Killer (NK) T-Zellen, B-Zellen und myeloische Zellen depletiert wurden.

Zur Depletion von Natural Killer (NK) T-Zellen wurde zunächst monoklonaler Maus-anti-Human-CD56 Antikörper direkt an anti-Maus-IgG-Dynabeads[®] gekoppelt.

Für eine totale Zellzahl von 1×10^7 Zellen wurden 100 μ l anti-Maus-IgG-Dynabeads[®] zweimal mit „RPMI-Medium“ gewaschen, mit 20 μ l Maus-anti-Human-CD56 Antikörper (0,2mg/ml) inkubiert und auf ein totales Volumen von 1 ml mit „RPMI-Medium“ gebracht. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Antikörper-Beads-Suspension zur Entfernung nicht gebundenen Antikörpers für 2 Minuten in den MPC-L gesteckt und die Dynabeads[®] nachfolgend zweimal mit „RPMI-Medium“ gewaschen und in 100 μ l „3% AB-Medium“ aufgenommen.

Für die Depletion von B-Zellen als auch für die Depletion von myeloischen Zellen wurden kommerziell erwerbliche anti-Human-CD19 und anti-Human-CD15 Dynabeads[®] eingesetzt. Für eine totale Zellzahl von 1×10^7 Zellen wurden je 100 μ l anti-Human-CD19- und anti-Human-CD15-Dynabeads[®] zweimal mit „RPMI-Medium“ gewaschen und in 200 μ l „3% AB Medium“ aufgenommen.

Die TZ wurden mit den gewaschenen CD56-, CD19- und CD15-Antikörper-konjugierten Dynabeads[®] ko-inkubiert und pro 1×10^7 Zellen auf ein totales Volumen von 2 ml „3% AB Medium“ gebracht. Die Inkubation erfolgte für ca. 20 Minuten bei 4°C auf dem Schüttler.

Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 Min. in den MPC-L gehalten. Der Überstand mit angereicherten TZ wurde abgenommen und weitere zweimal in den MPC-L gehalten, um eine akkurate Depletion von Beads-anhaftenden Zellen zu gewährleisten. Die Beads wurden verworfen. Es wurde eine TZ-Anreicherung von >95 % erzielt.

3.3.4.1.2 Anreicherung von Dendritischen Zellen mit Dynabeads[®]

Dendritischen Zellen (DZ) aus peripherem Blut oder Knochenmark-Blut (siehe 3.3) wurden vereinigt und die Anreicherung erfolgte über eine Depletion von T- und B-Zellen mit Hilfe von Dynabeads[®].

Für die Depletion von T- und B-Lymphozyten wurden kommerziell erwerbliche anti-Human-CD3 und anti-Human-CD19 Dynabeads[®] verwendet.

Für eine totale Zellzahl von 1×10^7 Zellen wurden je 100 μ l anti-Human-CD3 und anti-Human-CD19 Dynabeads[®] zweimal mit „RPMI-Medium“ gewaschen und in 200 μ l X-vivo aufgenommen. Die DZ wurden mit den gewaschenen Dynabeads[®] ko-inkubiert und auf ein totales Volumen von 2 ml X-vivo gebracht. Die Inkubation erfolgte für ca. 20 Minuten bei 4°C auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 Minuten in den MPC-L gehalten und der Überstand mit den angereicherten DZ abgenommen. Der Überstand wurde weitere zweimal in den MPC-L gehalten, um eine akkurate Depletion

der Beads-gebundenen Zellen zu gewährleisten, während die Beads verworfen wurden. Es wurde eine DZ-Anreicherung von >95 % erzielt.

3.3.4.2 Isolierung von naiven und Gedächtnis T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Separation über MACS-MicroBeads®

Frisch isolierte PBMZ wurden mit MACS-Puffer gewaschen und in 80 µl Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. Für die Separation naiver bzw. Gedächtnis T-Zellen wurden 20 µl CD45RO bzw. CD45RA MicroBeads® zugegeben und für 15 Min. bei 6-12 °C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit MACS-Puffer gewaschen, die Zellen für 10 Min. bei 1200 Upm zentrifugiert und in 500 µl Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen. Die Anreicherung naiver bzw. Gedächtnis T-Zellen erfolgte über die magnetische Depletion von CD45RO bzw. CD45RA positiven Zellen. Dazu wurden LS⁺/VS⁺ MACS Säulen zunächst mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen, in den Magneten gehalten und anschließend die Zellsuspension auf die Säule draufgegeben, Die MicroBeads®-ungebundenen Zellen werden nicht von der magnetischen Säule zurückgehalten und wurden durch dreimalige Zugabe von je 3 ml MACS-Puffer von der Säule gespült. Die Säule mit anhaftenden MicroBeads®-gebundenen Zellen wurde verworfen. Eine durchflußzytometrische Analyse der negativ selektionierten naiven bzw. Gedächtnis T-Zellen ergab in beiden Fällen eine Reinheit von über 95%.

3.3.5 Antigenbeladung von Dendritischen Zellen

Angereicherte DZ (siehe 3.4.1.2) wurden mit X-vivo auf eine Konzentration von 5-10 $\times 10^5$ /ml eingestellt und mit 200 µg/ml Zell- bzw. Gewebelysat oder mit 10 µg/ml Protein bzw. 10 µg/ml Peptid über Nacht oder nur im Falle von Protein für mindestens 3 Std. bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls wurde 10 ng/ml TGF-β1 zur Kultur zugegeben.

Als Peptide wurden das von MUC 1 abgeleitete, HLA-A2-bindende Peptid LLLLTVLTV und das von Insulin abgeleitete, HLA-A2-bindende Peptid HLVEALYLV eingesetzt, als Test-Antigen Tetanus Toxoid, als Positivkontroll-Antigen das bakterielle Superantigen SEB bzw. als Kontrollprotein Endobulin.

3.3.6 ELISpot-Test (*enzyme-linked immunospot assay*)

Der ELISpot-Test ist eine hochsensitive Methode, um einzelne antigenspezifische TZ innerhalb einer T-Zellpopulation direkt zu detektieren und zu quantifizieren. Lokal sezernierte Zytokine werden von einem Membrankonjugierten Antikörper gebunden, von einem zweiten, biotinylierten Antikörper detektiert und über eine Streptavidin-Enzymgekoppelte Farbreaktion visualisiert. Ein farbiger Punkt entspricht dabei einer einzelnen Zytokin-produzierenden Zelle.

Um ausschließlich Gedächtnis-T-Zell-Antworten zu untersuchen, wurden TZ in einer 40-stündigen Inkubation mit Antigen-präsentierenden autologen DZ *in vitro* stimuliert. Antigenspezifische T-Zellen wurden auf ihre IFN- γ , IL-4 bzw. IL-10 Zytokin-Produktion getestet.

Eine Membran-Mikrotiter-Platte wurde mit 100 μ l pro Loch (15 μ g/ml) anti-Human IFN- γ -, IL-4- bzw. IL-10-Antikörper für mindestens 3 Std. bei 37°C oder über Nacht bei 4°C überzogen und nachfolgend ungebundener, überschüssiger Antikörper durch drei- bis viermaliges Waschen mit 200 μ l pro Loch PBS entfernt. Die Mikrotiter-Platte wurde für eine Std. mit 200 μ l pro Loch „5% AB-Medium“ bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, und anschließend wieder drei- bis viermal mit 200 μ l pro Loch PBS gewaschen.

Die über Nacht in Zytokin-freiem Medium umgesetzten TZ wurden angereichert (siehe 3.4.1.1) und mit Zell- bzw. Gewebelysat oder mit Protein gepulsten, angereicherten DZ (siehe 3.4.1.2 und 3.5) in einem Verhältnis von 10:1 bis 5:1 (TZ : DZ) ko-inkubiert.

Für ELISpot-Tests mit organischem Material von Plasmozytom-Patienten wurden ausschließlich HLA-A2 positive TZ verwendet. Die Anreicherung und Co-Inkubation der TZ mit den DZ erfolgte wie oben beschrieben, jedoch wurde das Peptid erst zum Zeitpunkt der Ko-Inkubation zugegeben, da eine mehrstündige Prozessierung der Peptide nicht notwendig war. Die eingesetzte Zahl an TZ lag zwischen 4×10^4 - 1×10^5 . Das Flüssigkeitsvolumen pro Loch wurde mit „3% AB-Medium“ auf ein Endvolumen von 200 μ l gebracht. Alle Ansätze wurden in Triplikaten, in wenigen Ausnahmefällen in Duplikaten oder Quadruplikaten gemessen. Nach einer Inkubationsdauer von ca. 40 Stunden bei 37°C wurden die Überstände für ELISA-Tests gesammelt, mit 13000 UpM für 30 Min. bei 4°C zentrifugiert und bei -20°C aufbewahrt.

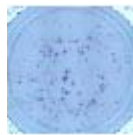
Die Mikrotiter-Platte wurde viermal mit 200 μ l pro Loch ELISpot-Waschpuffer gewaschen, verbliebene Zellen mit Wasser lysiert und die Platte erneut viermal gewaschen. Anschließend wurde mit 100 μ l (1 μ g/ml) biotinyliertem anti-Human IFN- γ Antikörper für zwei Std. bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde sechsmal gewaschen und pro Loch wurde nun mit 100 μ l (1 μ g/ml) Streptavidin-alkalische Phosphatase für 1,5 Std. bei 37°C

inkubiert, und anschließend fünfmal mit Waschpuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Die Substratreaktion erfolgte durch Inkubation von 100 µl pro Loch Substratlösung für 15 bis 30 Min. bei RT im Dunkeln und wurde nach ausreichender Entwicklung der Farbpunkte durch dreimaliges Waschen mit Wasser abgestoppt. Die Platte wurde zum Trocknen bei RT im Dunkeln aufbewahrt und die Membran erst in absolut trockenem Zustand auf eine Klebefolie übertragen.

Für die Kinetik der IFN- γ Antwort wurden a) unseparierte, naive und Gedächtnis T-Zellen (siehe 3.4.2) mit CD3-Dynabeads[®]-depletierten Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) aus frisch isolierten PBMZ im Verhältnis 5:1 wie oben beschrieben bzw. b) sortierte CM und EM (siehe 3.11.7) in Mikrotiterplatten, die zuvor über Nacht mit je 1 µg/ml anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28 Antikörper sowie 30 µg/ml IFN- γ beschichtet wurden, koinkubiert. Jeder einzelne Inkubations-Zeitpunkt wurde in einer eigenen Mikrotiterplatte durchgeführt und die Inkubation durch Waschen der einzelnen Platte zum jeweiligen Zeitpunkt abgestoppt.

Die Farbpunkte auf der Membran wurden im ELISpot-Mikroskop mit Hilfe der KS ELISpot Software ausgezählt.

Test-Antigen



Irrelevantes Antigen
(Negativkontrolle)

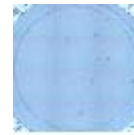


Abb. 2 Induzierte IFN- γ Farbpunkte auf der Membran einer ELISpot-Mikrotiterplatte.

Durch den Vergleich der eingesetzten Zahl an TZ mit der Gesamtzahl an ermittelten Farbpunkten kann nun die Frequenz der Antigen-spezifischen T-Lymphozyten ermittelt werden. Immunologische Reaktivität wird angenommen, wenn die Anzahl Zytokin-sezierender Zellen in den Gruppen mit Test-Antigen signifikant höher liegt ($p < 0,05$) als in jenen, die mit irrelevantem Antigen stimuliert wurden (siehe Abbildung 2).

3.3.7 IFN- γ Sekretions-Test

Der IFN- γ Sekretions-Test stellt eine weitere Methode dar, Antigen-spezifische T Zellen innerhalb einer T-Zellpopulation zu detektieren und zu quantifizieren. Die Methode beruht auf der Generierung einer Affinitätsmatrix für IFN- γ auf der Oberfläche von TZ, so dass bei einer Restimulation sezerniertes IFN- γ direkt an der Oberfläche der sekretierenden T-Zelle gebunden wird. Das gebundene Zytokin kann anschließend über einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper detektiert und im Durchflußzytometer (siehe 3.11) analysiert werden.

Der Vorteil gegenüber dem ELISpot-Test besteht darin, dass antigenspezifische T-Zellen ebenfalls auf phänotypische Marker untersucht und isoliert werden können.

DZ wurden angereichert (siehe 3.4.1.2) und für 20-25 Std. mit 10 μ g/ml Protein (Tetanus Toxoid, SEB bzw. Endobulin) bei 37°C inkubiert. Die TZ wurden übernacht in „8%AB-Medium“ ohne Zytokine kultiviert und am nächsten Tag angereichert (siehe 3.4.1.1). Anschließend erfolgte eine ca. 20-stündige Stimulation der TZ entweder a) mit Antigen-beladenen DZ im Verhältnis 10:1 (TZ:DZ), b) mit 0,5 μ g/ml Antikörper (anti-CD3, anti-CD28) + 0,5 μ g/ml Protein A pro eingesetzten Antikörper oder b) in einer anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28 Antikörper beschichteten Zellkulturplatte, die übernacht mit 2-3 ml 1 μ g/ml je Antikörper beschichtet wurde. Nachfolgend wurden die Zellen mit 5% Endobulin für 10-15 Min. inkubiert, mit 10 ml kaltem MACS Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 1.400 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 80 μ l kaltem „8% AB-Medium“ aufgenommen und mit 20 μ l IFN- γ Fang-Reagenz für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 ml warmes „8% AB-Medium“ zugegeben und für weitere 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension enthaltenden Reaktionsgefäße wurden alle 5 Minuten kurz mit der Hand geschüttelt. Nach Zugabe von 5 ml kaltem MACS Puffer wurde zentrifugiert (wie oben beschrieben) und das Zellsediment in 60-65 μ l kaltem MACS Puffer aufgenommen. Anschließend wurde mit 20 μ l R-PE-konjugiertem IFN- γ -Detektions-Antikörper und wahlweise mit a) 5 μ l FITC-konjugiertem anti-Human CD4-Antikörper, 5 μ l APC-Cy7-konjugiertem anti-Human CD8-Antikörper, 5 μ l APC-konjugiertem anti-Human CD45RA-Antikörper oder b) 5 μ l FITC-konjugiertem anti-Human CD4-Antikörper, 5 μ l FITC-konjugiertem anti-Human CD8-Antikörper, 5 μ l APC-konjugiertem anti-Human CD45RA-Antikörper, 5 μ l APC-Cy7-konjugiertem anti-Human CD62L-Antikörper für 10 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde mit 10 ml kaltem MACS Puffer gewaschen und das Zellsediment in 500 μ l FACS Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend mit 1 μ g/ml Propidiumiodid (PI) gefärbt (siehe 3.11.3) und im Durchflußzytometer analysiert.

3.3.8 ELISA-Test (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*)

Mit Hilfe des ELISA-Tests lassen sich lösliche Moleküle, wie z.B. Zytokine oder Prostaglandine in Zellkulturüberständen, Plasma, Serum sowie in Lysaten quantifizieren. Es wurden die Mengen an IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, TGF- β 1 und PGE₂ in Zellkulturüberständen aus ELISpot-Experimenten, im Plasma, in Tumor-Lysaten aus Primärtumoren bzw. Lymphknotenmetastasen sowie in MCF-7-Zell-Lysaten untersucht. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass die zu untersuchenden Proben in einer Mikrotiterplatte inkubiert werden, die mit einem polyklonalen Zytokin-spezifischen Antikörper überzogen ist. Das in den Proben befindliche Zytokin wird durch einen zweiten Enzym-konjugierten Zytokin-spezifischen Antikörper detektiert. Dieser katalysiert in einer nachfolgenden Substratreaktion die Bildung eines farbigen Produkts, wobei die Farbentwicklung direkt proportional zur Menge an gebundenem Zytokin ist. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe bekannter Zytokin-Standard-Konzentrationen kann eine Eichkurve erstellt werden, und so die Menge an vorhandenem Zytokin quantitativ ermittelt werden.

Für folgende ELISA-Tests gab es jedoch Abweichungen zum oben beschriebenen funktionellem Prinzip. Im Falle von TGF- β 1 war die Mikrotiter-Platte mit TGF- β Rezeptor Typ II überzogen. Latentes TGF- β 1 musste zunächst durch Ansäuerung und nachfolgende Neutralisierung zu immunreaktivem, detektierbarem TGF- β 1 aktiviert werden.

Für die hochsensitive Quantifizierung von IL-4, IL-10 und IL-12 wurde eine Verstärkung des Signals durch einen zusätzlichen Schritt erzielt. Das an den Zytokin-spezifischen Antikörper konjugierte Enzym alkalische Phosphatase (AP) dephosphoryliert Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) zu Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH), welches als spezifischer Co-Faktor zur Aktivierung eines Reduktions-Oxidations-Kreislaufs dient. In diesem Kreislauf katalysiert das Enzym Diaphorase die Reduktion eines Tetrazolium-Salz zu einem intensiv gefärbtem Formazan-Farbstoff unter gleichzeitiger Oxidation von NADH zu NAD⁺. Letzteres dient wiederum als Co-Faktor in einer nachfolgenden Alkohol-Dehydrogenase katalysierten Reaktion, bei der NADH durch Oxidation von Ethanol regeneriert wird. Die Reduktionsrate des Tetrazolium-Salzes und somit die Menge des farbigen Reaktionsprodukts ist direkt proportional zur Menge an Platten-gebundenem Zytokin.

Der ELISA-Test zur Quantifizierung von PGE₂ beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. In Testproben befindliches PGE₂ konkurriert mit AP-konjugiertem PGE₂ um die Bindung an einen polyklonalen Maus-anti-Human PGE₂-Antikörper, der wiederum von immobilisierten Ziege-anti-Maus Antikörper auf einer Mikrotiter-Platte gebunden wird. In der nachfolgenden Enzymreaktion erfolgt die Umwandlung des Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt, wobei die Farbintensität umgekehrt proportional zur Menge an in der

Probe befindlichem PGE_2 ist. Bei der Untersuchung von Gewebe- bzw. MCF-7-Zell-Lysaten wurde zuvor eine PGE_2 -Extraktion der Proben mit Hilfe von Amprep C18-Säulen durchgeführt, um Störfaktoren im nachfolgenden ELISA-Test zu minimieren.

ELISA-Mikrotiter-Platten von BD Pharmingen mussten mit dem Zytokin-spezifischen Antikörper beschichtet werden, während die Platten von R&D Systems bereits beschichtet waren. Bei allen ELISA-Tests mussten vor Versuchsbeginn alle Reagenzien und Proben auf RT gebracht werden. Alle Ansätze wurden in Duplikaten gemessen.

3.3.8.1 IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-15 ELISA-Tests von BD Pharmingen

Eine unbeschichtete Mikrotiter-Platte wurde mit 100 μl pro Loch monoklonalem Zytokin-spezifischem Antikörper bei 4°C übernacht beschichtet, am nächsten Tag dreimal gewaschen und mit 200 μl pro Loch PBS + 10% FKS für 1 Std. bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurden 100 μl Standard bzw. Probe pro Loch für 2 Std. bei RT inkubiert. Die Platte wurde fünfmal gewaschen und mit 100 μl einer Detektions-Antikörper-/Enzym-Lösung für 1 Std. bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde siebenmal gewaschen, pro Loch 100 μl Substratlösung zugegeben und für 30 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 μl Stop-Lösung pro Loch beendet und die Absorption innerhalb der folgenden 30 Min. im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

3.3.8.2 IFN- γ , IL-4, IL-10 und IL-12 ELISA-Tests von R&D Systems

Pro Loch der beschichteten IFN- γ Mikrotiter-Platte wurden 100 μl Test-Verdünnungs-Lösung vorgelegt und mit 100 μl Standard bzw. Probe pro Loch für 2 Std. bei RT inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und mit 200 μl IFN- γ Konjugat pro Loch erneut für 2 Std. bei RT inkubiert. Anschließend wurde viermal gewaschen und 200 μl Substratlösung pro Loch zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Min. bei RT im Dunkeln wurde mit 50 μl Stop-Lösung pro Loch abgestoppt und die Absorption innerhalb der nachfolgenden 30 Min. bei 450 nm im Photometer gemessen.

Für IL-4, IL-10 bzw. IL-12 ELISA-Tests wurden pro Loch der beschichteten Mikrotiter-Platte 50 μl Test-Verdünnungs-Lösung vorgelegt mit 200 μl Standard bzw. Probe pro Loch vermischt. Für IL-4 und IL-12 ELISA-Tests wurde für 3 Std. bei RT und für IL-10 ELISA-Tests für 2 Std. bei RT auf dem Schüttler ($500 \pm 50 \text{ UpM}$) inkubiert. Anschließend wurde vier- bis sechsmal gewaschen und mit 200 μl Konjugat pro Loch für 2 Std. bei RT

(für IL-10 auf dem Schüttler) inkubiert. Die Platte wurde vier- bis sechsmal gewaschen und mit 50 µl Substratlösung pro Loch für 1 Std. bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden 50 µl Verstärker-Lösung pro Loch zugegeben und für weitere 30 (IL-4 und IL-12) bzw. 60 Min. (IL-10) bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stop-Lösung pro Loch beendet und die Absorption innerhalb von 30 Min. bei 490 nm im Photometer gemessen.

3.3.8.3 TGF-β1 ELISA-Test von R&D-Systems

3.3.8.3.1 Aktivierung von latentem TGF-β1

Zur Aktivierung von latentem zu immunreaktivem TGF-β1 wurden 330 µl Zellkulturüberstand bzw. Lysat mit 66 µl 1 N Salzsäure vermischt, für 10 Min. bei RT inkubiert und anschließend mit 66 µl einer 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES-Lösung neutralisiert. Plasmaproben wurden vor einer TGF-β1-Aktivierung bei 10.000 g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert, um vorhandene Blutplättchen zu entfernen. 100 µl Plasma wurden mit 100 µl 2,5 N Essigsäure/10 M Harnstoff vermischt, für 10 Min. bei RT inkubiert und mit 100 µl 2,7 N NaOH/1 M HEPES neutralisiert. Anschließend wurden die Plasmaproben 1:4 mit Kalibrator-Verdünnungslösung verdünnt.

3.3.8.3.2 Durchführung des TGF-β1 ELISA-Tests

Pro Loch der beschichteten ELISA-Mikrotiter-Platte wurden 200 µl Standard bzw. aktivierte Probe für 3 Std. bei RT inkubiert, die Platte nachfolgend dreimal gewaschen und 200 µl Konjugat pro Loch zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 1,5 Std. wurde erneut dreimal gewaschen und mit 200 µl Substrat-Lösung pro Loch für 20 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Substratreaktion wurde mit 50 µl Stop-Lösung pro Loch beendet und die Absorption innerhalb der nachfolgenden 30 Min. bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer gemessen.

3.3.8.4 PGE₂-ELISA-Test von R&D-Systems

3.3.8.4.1 Säulen-Extraktion von PGE₂ aus Gewebe- und MCF-7-Zell-Lysaten

500 µl Gewebe- bzw. MCF-7-Zell-Lysate wurden mit 500 µl einer 1:4 Wasser-Ethanol-Lösung und 10 µl Essigsäure vermischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde bei RT für 2 Min. bei 2500 g zentrifugiert und der Überstand auf eine 100 mg

Amprep C18-Säule gegeben, die zuvor zweimal mit je 1ml 10% Ethanol äquiliert worden war. Die Säule wurde einmal mit 1ml ddH₂O und nachfolgend einmal mit 1ml Hexan gewaschen. Anschließend wurde das Säulen-gebundene PGE₂ durch Zugabe von zweimal 750 µl Essigsäure-Ethylester eluiert und aufgefangen.

Das Eluat wurde bei –20°C aufbewahrt und am Versuchstag unter einem Strom von gasförmigem Stickstoff eingedampft. Die getrockneten Proben wurden in 50 µl Ethanol aufgenommen und mit 200 µl Test-Puffer ED1 vermischt.

3.3.8.4.2 Durchführung des PGE₂-ELISA-Tests

Der PGE₂-Standard wurde mit Test-Puffer ED1 verdünnt. Jeweils 100 µl Standard- bzw. Proben-Lösung wurden mit 50 µl PGE₂ HS Konjugat und 50 µl PGE₂ HS Antikörper-Lösung pro Loch der beschichteten Mikrotiter-Platte inkubiert. 150 µl Test-Puffer ED1 pro Loch wurde als Kontrolle für unspezifische Bindung (*Non-Specific Binding*, NSB) gegeben. Es wurde für 18-24 Std. bei 2-8°C inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen und 200 µl Substrat pro Loch zugegeben. Als weitere Kontrollen wurden 200 µl Substrat mit 5 µl PGE₂ HS Konjugat (*Totale Aktivität*, TA) sowie nur Substrat inkubiert. Die Substratreaktion wurde bei 37°C für 1 Std. durchgeführt und mit 50 µl Stop-Lösung pro Loch beendet. Die Absorption wurde sofort bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer gemessen.

3.3.9 ⁵¹Chrom-Freisetzungstest (Zytotoxizitätstest)

Der ⁵¹Chrom-Freisetzungstest stellt eine sensitive und spezifische Methode zur Analyse der zytotoxischen Aktivität aktivierter CD8-T-Zellen dar. Dabei wird die Bestimmung abgetöteter ⁵¹Chrom-markierter Zielzellen als Nachweis für die Generierung aktivierter zytotoxischer Effektor-T-Zellen benutzt. Vitale Zielzellen werden mit radioaktivem Natriumchromat (Na₂⁵¹CrO₄) durch Einbau in Zellproteine markiert und setzen im Falle einer spezifischen Zell-Lyse im Zellinnern gebundenes radioaktives Chrom in den Überstand frei.

Es wurde die zellvermittelte zytotoxische Aktivität von MUC 1-Peptid-stimulierten T-Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark-Blut von Patienten mit Multiplem Myelom untersucht. Als Zielzellen wurden MUC1-Peptid bzw. Insulin-Peptid präsentierende K562-Tumorzellen eingesetzt.

Generierung zytotoxischer T-Zellen

Expandierte und angereicherte $1 - 2 \times 10^6/\text{ml}$ T-Zellen (siehe 3.4.1.1) aus peripherem Blut und Knochenmark-Blut von Patienten mit Multiplem Myelom wurden 7-8 Tage lang mit autologen DZ im Verhältnis 1:10 bis 1:20 (siehe 3.5) und $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ MUC 1-Peptid in „3% AB-Medium“ bei 37°C stimuliert. Ab dem dritten Tag wurde die Zellen mit „3% AB-Medium + 20 U/ml IL-2“ kultiviert.

Konjugation der Zielzellen mit Antigen und radioaktive Markierung

Die Zielzellen waren vor dem Markieren in der exponentiellen Wachstumsphase (z.B. 5×10^5 Zellen/ml Kultur), um das ^{51}Cr optimal aufzunehmen. 2×10^6 K562-Zellen wurden in 2 ml X-vivo übernacht mit $20 \mu\text{g}$ MUC 1-Peptid bzw. Insulin-Peptid und $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ G418 bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zentrifugiert und das Zellsediment in $200 \mu\text{l}$ X-vivo aufgenommen. Die Zellen wurden in einem 5ml-Röhrchen mit $200 \mu\text{Ci}$ Natriumchromat-Lösung für 90 Min. bei 37°C inkubiert, wobei nach 45 Min. Inkubationszeit die Zellen nochmals aufgeschüttelt wurden. Anschließend wurden die chromierten Zellen viermal mit X-vivo gewaschen und auf eine Zellzahl von $3 \times 10^4/\text{ml}$ eingestellt.

Ko-Inkubation von Effektor- und Zielzellen

Die generierten Effektor-Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark-Blut wurden mit X-vivo gewaschen und auf eine Zellzahl von $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden je $200 \mu\text{l}$ pro Loch auf eine 96-Loch-Rundbodenplatte gegeben und mit X-vivo eine serielle 1:2 Verdünnung ausgeführt. Durch Zugabe von je $100 \mu\text{l}$ Zielzellen und damit einer konstanten Zahl von 3×10^3 Zielzellen pro Loch ergaben sich folgende Effektor zu Zielzellen Verhältnisse: 50:1, 25:1, 12:1, 6:1 und 3:1. Zielzellen alleine dienten als Maß für die spontan freigesetzte Menge an ^{51}Cr , der als Hintergrund definiert ist. Das Endvolumen pro Loch betrug immer $200 \mu\text{l}$. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt.

Die Platte wurde für 3 Min. bei 500 UpM zentrifugiert, in Folie gewickelt und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte für 3 Min. bei 1000 UpM zentrifugiert und aus jedem Ansatz $100 \mu\text{l}$ Kulturüberstand in ein Gamma-Zählerröhrchen überführt. Zur Bestimmung der maximalen Chromfreisetzung dienten je $50 \mu\text{l}$ der Zielzellensuspension mit 3×10^3 Zielzellen in Triplikaten. Alle Röhrchen wurden mit flüssigem Paraffinwachs verschlossen und die enthaltene Radioaktivität in einem Gamma-Zähler gemessen.

Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Messwert der Probe} - \text{Spontanfreisetzung}}{\text{Maximalfreisetzung} - \text{Spontanfreisetzung}} \times 100$$

Immunologische Reaktivität wird angenommen, wenn die spezifische Lyse in den Gruppen mit Test-Antigen signifikant höher liegt ($p < 0,05$) als in jenen, die mit irrelevantem Antigen stimuliert wurden.

3.3.10 Stimulationsprotokolle zum Nachweis intrazellulärer Moleküle mit Hilfe der Durchflußzytometrie

Zum Nachweis von intrazellulärem IFN- γ , IL-4 bzw. IL-10 wurden angereicherte TZ mit Protein-beladenen DZ (siehe 3.4.1, 3.5) im Verhältnis 5:1 bis 10:1 in Gegenwart von 6 μ l Golgi-Plug bzw. 4 μ l Golgi-Stop pro 6 ml Kulturmedium bei 37°C für die im Ergebnisteil indizierten Inkubationszeiten stimuliert. Golgi Plug bzw. Golgi Stop enthalten die Protein-Transportinhibitoren Brefeldin A bzw. Monensin, welche eine Akkumulation des entsprechenden Zytokins im Golgi-Komplex bewirken und somit seine Detektierbarkeit erhöhen. Die Zellen wurden anschließend zur durchflußzytometrischen Untersuchung angefärbt (siehe 3.11.1 und 3.11.2).

Zur Detektion von vesikulärem Perforin wurden angereicherte TZ und Peptid-beladene DZ (siehe 3.4.1, 3.5) im Verhältnis 10:1 bis 20:1 für 7 Tage bei 37°C stimuliert und die Zellen anschließend wie in 3.11.1 und 3.11.2 beschrieben gefärbt.

Zur Stimulation sortierter CM und EM Zellen wurden Zellkulturplatten übernacht mit 2-3 ml je 1 μ g/ml anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28 Antikörper beschichtet und anschließend die frisch sortierten CM und EM Zellen (siehe 3.11.7) übernacht in den Platten stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte CM und EM Zellen. Am folgenden Tag wurden die Zellen in unbeschichtete Zellkulturplatten umgesetzt. Zu jedem der im Ergebnisteil indizierten Zeitpunkte wurden a) Zellen zur sofortigen Färbung von Oberflächenmolekülen entnommen (siehe 3.11.1) oder b) zum Nachweis von intrazellulärem IFN- γ und mitochondrialem Apo2.7 (siehe 3.11.4.2) Zellen entnommen und in Gegenwart von Golgi-Stop bzw. Golgi-Plug für ca. 8 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend gefärbt (siehe 3.11.2).

3.3.11 Durchflußzytometrie und Immunfluoreszenz

Die Durchflußzytometrie (Weir 1996, Coligan 1991, Ausubel 1987) ist ein Verfahren, bei dem Partikel und Zellen in einem Flüssigkeitsstrom charakterisiert und quantifiziert werden können. Grundsätzlich können alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung, Lichtstreuung oder Fluoreszenz beschreiben lassen, zur durchflußzytometrischen Analyse herangezogen werden. Lichtbeugung und Lichtstreuung lassen z.B. Aufschluß auf Größe sowie Binnenstruktur von Zellen, Zellorganellen oder auch Kunststoffpartikeln zu. Außerdem können definierte Zelloberflächenstrukturen oder intrazelluläre Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörper untersucht werden.

Einzelne Zellen fließen in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Laserstrahl und induzieren eine Lichtstreuung, die zellgebundene Farbstoffe zur Fluoreszenz anregt. Photomultiplier detektieren sowohl das gestreute Licht, das Auskunft über Größe und Granularität der Zellen gibt, sowie die Fluoreszenz, die die Expression von Antigenen auf der Zelloberfläche oder im Zellinnern nachweist.

Das FACS (*fluorescence activated cell sorter*) ist ein Durchflußzytometer mit einem FACScan (Zellscanner) und einem FACSvantage (Zellsortierer). Eine spezielle Sortiereinrichtung beim FACSvantage ermöglicht neben einer Detektion die Isolierung einer durchflußzytometrisch definierten Zellpopulation zur Expansion als auch für weitere funktionelle Untersuchungen.

Die Fluoreszenzemission wurde mit einem Argon-Krypton-Laser bei 488 nm angeregt und die relative Grün- (FITC-konjugierter Antikörper), Orange- (PE-konjugierter Antikörper) bzw. Rot-Fluoreszenz (CyChrome- und PeC7, PI-konjugierter Antikörper) bestimmt. Mit einem Helium-Neon-Laser wurde bei 366 nm die relative Tieftrot-Fluoreszenz (APC-konjugierter und APC-Cy7-Antikörper) bestimmt. Zur Analyse wurde die CELLQuest- bzw. FlowJo-Software verwendet. Es wurden je nach Experiment 30.000 bis 2×10^6 Ereignisse gezählt und analysiert.

3.3.11.1 Nachweis von Oberflächenmolekülen

Pro Ansatz wurden 2×10^5 – 2×10^6 Zellen einmal mit kaltem FACS Puffer gewaschen und anschließend in 50-100 µl (2,5 mg/ml) Endobulin aufgenommen und für ca. 15 Minuten auf Eis inkubiert. Endobulin enthält humanes IgG, welches Fc-Rezeptoren und somit unspezifische Bindungsstellen auf den Zellen blockiert. Die Zellen wurden einmal mit FACS Puffer gewaschen und in 50 – 100 µl FACS-Puffer für 15 Min. auf Eis mit dem jeweiligen Erstantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 300 µl

Puffer gewaschen und gegebenenfalls mit dem Zweitantikörper in einem Volumen von 100 µl für 20 Min. auf Eis gefärbt. Die Zellen wurden erneut gewaschen. Wurde ein dritter Antikörper eingesetzt, so wurde wie beim Zweitantikörper verfahren. Nach Beendigung der Färbung wurden die Zellen in 50 – 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.

Die Inkubationen mit den Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern erfolgte im Dunkeln. Die optimalen Verdünnungen der Antikörper mit FACS Puffer wurden in Vorexperimenten ermittelt. Pro Ansatz ließen sich bis zu fünf verschiedene Farbstoffe einsetzen.

3.3.11.2 Nachweis von intrazellulären Molekülen

Neben Oberflächenantigenen können auch intrazelluläre Proteine angefärbt werden. Zur intrazellulären Färbung müssen die zu untersuchenden Zellen allerdings fixiert und permeabilisiert werden, damit fluoreszenzmarkierte Antikörper ins Zellinnere eindringen und das entsprechende Protein binden können.

Die Färbung der intrazellulären Antigene erfolgte erst nach Beendigung der Färbung von Oberflächenmolekülen. Die Fixierung und Permeabilisierung erfolgte gleichzeitig. Zunächst wurden die Zellen in 100 µl Cytofix-Cytoperm™ aufgenommen und für 20 Min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Gewaschen wurde anschließend einmal mit Perm/Wash™-Puffer und die Zellen für 30 Min. auf Eis im Dunkeln mit 100 µl intrazellulärem Antikörper inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Isotyp-Antikörper verwendet. Nachfolgend wurde zweimal mit Perm/Wash™-Puffer gewaschen und die Zellen in 50 – 100 µl FACS-Puffer aufgenommen.

3.3.11.3 Nachweis von toten Zellen durch Propidiumjodid-Inkorporation

Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der im spät-apoptotischen und nekrotischen Zustand der Zellen sofort nach einsetzender Permeabilisierung der Zellmembran inkorporiert wird und in die DNA interkaliert. Es kann sowohl zur Ermittlung der Anzahl toter Zellen in der Gesamtzellpopulation eingesetzt als auch zum Ausschluß toter Zellen bei der Analyse definierter Oberflächenmoleküle herangezogen werden. Nach der letzten Färbung mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe 3.11.1) wurde kurz vor der Messung 1 µg/ml PI zugegeben und die Zellen mindestens für 1 Minute inkubiert.

3.3.11.4 Bestimmung von apoptotischen Zellen

3.3.11.4.1 Färbung von Phosphatidylserin durch Annexin V

In der frühen Phase der Apoptose bleibt zwar die Integrität der Zellmembran erhalten, jedoch verliert die Zelle die Asymetrie ihrer Phospholipide (Martin et al. 1995, Diaz and Schroit 1996). Phosphatidylserin (PS) ist ein negativ geladenes Phospholipid, das an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert ist und beim Eintritt der Zelle in die Apoptose an die Oberfläche exponiert wird und somit ein spezifisches Signal für die Erkennung und Entfernung apoptotischer Zellen durch Makrophagen darstellt (Fadok et al. 1992, Verhoven et al. 1995). PS kann durch Annexin V, einem Calcium- und Phospholipid-bindendem Protein, das mit hoher Affinität an PS bindet, detektiert werden.

5 – 10 $\times 10^5$ Zellen wurden nach der letzten Färbung mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern einmal mit FACS Puffer gewaschen, in 300 μ l Annexin V-Bindungs-puffer aufgenommen und mit 3 μ l FITC-konjugiertem Annexin V für 10 Min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen gefärbt, die zuvor 30 Min. lang mit 300 μ l 3% Formaldehyd auf Eis inkubiert worden waren. Anschließend wurden 3 μ l PI zugegeben und die Zellen im Durchflußzytometer analysiert.

3.3.11.4.2 Intrazelluläre Färbung mit Apo2.7

Apo2.7 Antikörper reagieren mit dem 38 kDa schweren, mitochondrialem Membranprotein 7A6 Antigen, welches von apoptotischen Zellen früh exponiert und im Durchflußzytometer nachgewiesen werden kann. Die Funktion des Proteins ist noch unbekannt, es wird jedoch eine Involvierung in der molekularen Kaskade der Apoptose vermutet (Zhang et al. 1996, Roth et al. 1996).

Die Zellen wurden nach der letzten Färbung mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe 3.11.1) wie unter 3.11.2 beschrieben fixiert, permeabilisiert und mit dem Antikörper für intrazelluläres Apo2.7 sowie zur Negativkontrolle mit einem Isotyp-Antikörper gefärbt und anschließend im Durchflußzytometer gemessen.

3.3.11.5 Identifizierung von HLA-A2 positiven Lymphozyten

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) besteht aus einer Gruppe zusammenhängender genetischer Loci, die für viele Proteine codieren, die bei der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle spielen. Beim Menschen wird der MHC als HLA

(Humanes Leukozyten Antigen) bezeichnet, wobei eines von drei Hauptgenen der Klasse I als HLA-A bezeichnet wird. Die MHC-Gene sind dabei hochpolymorph, da es für jedes Gen multiple Allele gibt. Das am häufigsten vertretene HLA Klasse I Allel in westlich-kaukasischen Populationen ist das HLA-A2. Da die MHC-Restriktion von T-Zellen bei der Peptidantigen-Erkennung von entscheidender Bedeutung ist, wurden für Tetramer-, Zytotoxizitäts-, Tierexperimente sowie bei ELISpot-Untersuchungen von Plasmazytomzellen, Lymphozyten vor ihrem Einsatz auf HLA-A2 Positivität untersucht. Die Zellen wurden mit 50 µl anti-Human HLA-A2 Antikörper aus Hybridomüberständen gefärbt (siehe 3.11.1), über einen Zweitantikörper detektiert und im Durchflußzytometer analysiert. Als Positivkontrolle wurden HLA-A2 positive T2-Zellen eingesetzt.

3.3.11.6 Tetramer-Färbung

Eine Methode, um Antigen-spezifische T-Zellen in einer T-Zellpopulation zu identifizieren und quantifizieren, ist die Tetramer-Färbung. MHC Klasse I-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse I Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über konjugiertes R-PE im Durchflußzytometer visualisiert. Die Methode beruht auf der Wechselwirkung des antigen-spezifischen T-Zellrezeptors mit den Peptid-gebundenen MHC Klasse I Komplexen.

Zur Evaluierung TAA-spezifischer CD8⁺-T-Zellen wurden Tetramere eingesetzt, die aus MUC 1 (LLLLTVLTV)- bzw. Her-2/neu (KIFGSLAFL)-Peptid-präsentierenden MHC HLA-A2-Komplexen zusammengesetzt waren. Als Negativkontrolle dienten HIV (SLYNTVATL)-Tetramere. 1 – 2 x10⁶ HLA-A2-positive T-Zellen aus peripherem Blut und Knochenmark-Blut von Patienten mit Brustkrebs oder MM sowie von gesunden Spendern wurden zunächst wie unter 3.11.1 beschrieben mit Antikörpern gegen CD8 sowie z.T. gegen CD45RA und CD62L gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer für 15 bzw. 45 Min. mit 100 µl (1:100) R-PE-konjugiertem Peptid-Tetramer auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde einmal gewaschen und kurz vor der Messung im Durchflußzytometer 1 µg/ml PI zu den Zellen gegeben.

3.3.11.7 Sortierung von CM und EM mit Hilfe des FACSvantage

Frisch isolierte PBMZ (siehe 3.3) wurden wie unter 3.3.11.1 beschrieben mit folgenden Antikörpern wahlweise angefärbt:

- a) CD4-FITC, CD8-FITC, CD45RA-APC, CCR7 + IgM-PE, CD62L-APC-Cy7
- b) CD4-FITC, CD8-FITC, CD45RA-APC, CCR7-PE, CD62L-APC-Cy7
- c) CD4-APC, CD8-APC, CD45RA-FITC, CCR7-Biotin + SA-PE-Cy7, CD62L-PE
- d) CD4-APC-Cy7, CD8-APC-Cy7, CD45RA-APC, CCR7-PE, CD62L-FITC

Die gefärbten Zellen wurden zunächst auf Gedächtnis T-Zellen ($CD4^+CD8^+CD45RA^+$) eingegrenzt und schließlich nach CM ($CCR7^+/CD62L^+$) und EM ($CCR7^-/CD62L^-$) mit Hilfe der Sortiereinrichtung des FACSvantage sortiert.

3.4 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Mit Hilfe der Immunhistochemie kann das Verteilungsmuster von Molekülen auf oder in ganzen Zellen oder in einem Gewebeschnitt ermittelt werden. Bei dieser Methode werden Enzym-gekoppelte Antikörper eingesetzt, die ein farbloses Substrat *in situ* in ein farbiges Reaktionsprodukt umsetzen. Dessen Ablagerungen können im Lichtmikroskop direkt detektiert werden und geben anhand ihrer Häufigkeit, Intensität und Position Aufschluß über die Expressionsstärke sowie die Verteilung eines Moleküls im Zell- und Gewebeverband.

3.4.1 Schneiden und Fixieren

Knochenmark-Stanzen von Patienten mit Multiplem Myelom bzw. die aus NOD/Scid-Mäusen entnommenen Organe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Die gefrorenen Organe wurden mit einem Kryostat bei -25°C geschnitten ($5-7\ \mu\text{m}$), mit einem unbeschichteten Objektträger abgenommen und für mindestens 30 Min. an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden dann für 10 Min. in Aceton/0,3% H_2O_2 fixiert und für mindestens 10 Min. bei RT getrocknet.

3.4.2 Einfachfärbung mit Enzym-konjugierten Zweitantikörpern

Nach Trocknung der Schnitte wurde mit 100 µl verdünnter Erstantikörperlösung (1:100 in AK-Verdünnungspuffer) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten mit PBS/0,01% Tween 20 auf dem Schüttler gewaschen. Es folgte die Inkubation mit einem Enzym-konjugierten Zweitantikörper (1-2 Tropfen Meeretichperoxidase) für 30 Minuten. Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Substratreaktion mit AEC Chromogen bzw. BCIP-NBT für Peroxidase (PO) bzw. für alkalische Phosphatase (AP) bei RT auf dem Schüttler. Die Substratreaktion variierte nach verwendetem Chromogen und gefärbtem Oberflächenmolekül. Die Intensität wurde durch regelmäßige Kontrolle unter dem Mikroskop überprüft.

Nach Abstoppen der Substratreaktion durch Waschen mit Wasser wurden die Schnitte mit 50% Hämalaun-Lösung gegengefärbt und anschließend erneut mit Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Objektträger wurden mit flüssiger Glyzeringelatine eingedeckt. Alle Inkubationen erfolgten bei RT in einer Feuchtekammer.

Schließlich wurden die Objektträger unter dem Lichtmikroskop analysiert und die gefärbten Zellen ausgezählt.

3.4.3 Mehrfachfärbungen

Für Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Einzelfärbungen nacheinander durchgeführt, wobei alle Einzelfärbungen mit der jeweiligen Substratreaktion beendet wurden, bevor die nächste Färbung angeschlossen wurde.

Die Gegenfärbung mit Hämalaun wurde nicht durchgeführt.

3.5 Tierexperimentelle Methoden

3.5.1 Subkutane Injektion von U266 Tumorzellen in NOD/Scid Mäuse

Die *in vivo* Experimente wurden an sechs bis zwölf Wochen alten NOD/Scid (*non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*) Mäuse durchgeführt.

Sowohl die Tierhaltung als auch die Versuche wurden unter keimfreien Bedingungen in der Barriere IV des Zentralen Tierlabors des Deutschen Krebsforschungszentrums durchgeführt.

Aufgrund der Immundefizienz der NOD/Scid-Mäuse eignet sich dieses Mausmodell besonders gut zur Transplantation von hämatologischen sowie soliden humanen

Tumoren. Es ermöglicht nicht nur funktionale und histologische Untersuchungen von Tumoren, sondern auch die Untersuchung von Tumor-Immunzell-Interaktionen anhand einer Tumorreduktion bzw. -abstoßung.

Als Injektionsstelle wurde der Bauchbereich über dem linken Bein gewählt. Um das Tumorstadium besser protokollieren zu können, wurde subkutan (s.c.) injiziert. Der Vorteil der s.c. Injektion besteht darin, dass es sich um eine vergleichsweise einfach durchzuführende Verabreichungsart handelt und relativ große Mengen appliziert werden können. Vor der Impfung wurde die Injektionsstelle rasiert und desinfiziert.

Die Maustumore wurden einmal in der Woche gemessen. Das Tumorstadium berechnet sich aus folgender Formel: $\text{Tumorstadium} = \text{Breite}^2 \times \text{Länge} \times \pi / 6$

3.5.2 Sezierung von Maustumoren

Tumortragende Mäuse mit einem größeren Tumorstadium als 280 mm³ wurden aus der Barriere ausgeschleust, sezert und präpariert. Es wurden der Tumor, die Leber und die Milz zügig entfernt und in flüssigem Stickstoff schockeingefroren. Die restlichen Organe der Maus wurden bei Verdacht auf Metastasen genau untersucht. Der Tumor wurde für spätere histologische Untersuchungen bei -70 °C aufbewahrt.

3.5.3 Adoptiver Transfer von reaktivierten T-Lymphozyten

Einige der tumortragenden Mäuse wurden ca. 6 Wochen nach s.c. Implantation von kleineren U266-Tumorstückchen zur adoptiven Immuntherapie herangezogen. Angereicherte TZ (siehe 3.4.1.1) aus dem peripheren Blut und Knochenmark-Blut von Plasmazytom-Patienten wurden für zwei Tage mit 10 µg/ml MUC-1- bzw. Insulin-markierten DZ im TZ:DZ-Verhältnis 20:1 aktiviert (siehe 3.5). Pro tumortragende Maus wurden ca. 4x10⁶ T-Zellen aus dem Blut bzw. Knochenmark-Blut intraperitoneal injiziert, die entweder mit MUC-1 oder Insulin Peptidantigen stimuliert worden waren.

Diese Applikationsart gewährleistet eine verhältnismäßig schnelle Aufnahme einer Substanz in den Organismus, da das Bauchfell eine große Oberfläche besitzt und mit vielen Blutgefäßen ausgestattet ist. Es wurden zwei verschiedene Proben appliziert: mit MUC-1 stimulierte und Insulin stimulierte T-Zellen. Unbehandelte, tumortragende Mäuse dienten als Kontrolle für das ungehemmte Wachstum.

Das Tumorstadium wurde einmal pro Woche protokolliert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von Tumorantigen spezifischen T-Zellen beim Multiplen Myelom

Beim Mammakarzinom konnten kürzlich hohe Frequenzen Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark und Blut nachgewiesen werden (Feurerer et al. 2001a). Lediglich die TAA-spezifischen Zellen aus dem Knochenmark jedoch nicht die aus dem Blut konnten zu IFN- γ produzierenden und zytotoxischen Effektor T-Zellen reaktiviert werden.

Hier sollte geklärt werden, ob die Generierung TAA-reaktiver Gedächtnis T-Zellen und deren Lokalisation im Knochenmark von Tumorkranken ein allgemeines Merkmal maligner Erkrankungen ist und nicht nur in soliden Tumoren, sondern auch in hämatologischen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden kann. Das Multiple Myelom (MM) gehört zu den häufigsten hämatologischen Tumorerkrankungen und wurde deshalb zur Klärung dieser Fragestellung näher untersucht. Da hierzu keine autologen Tumorspezies verfügbar waren, wurde das beim MM überexprimierte MUC-1 als TAA verwendet (LLLLTVLTV). Es ist MHC Klasse I HLA-A2 restringiert und kann somit nur von spezifischen CD8 T-Zellen erkannt werden (Brossart et al. 2001).

4.1.1 Detektion MUC 1-spezifischer Gedächtnis CD8 T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom

Es sollte zunächst geklärt werden, ob MUC-1 spezifische T-Zellen bei Patienten mit multiplem Myelom generiert werden und aus welchen Kompartimenten (Blut, Knochenmark) solche Zellen isoliert werden können.

Die Frequenz MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen in Blut und Knochenmark wurde mit Hilfe von HLA-A*0201-Peptid Tetramer-Analysen bestimmt.

Rekombinante MHC Tetramere ermöglichen die Identifizierung und Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen. Diese multimeren MHC-Peptid-Komplexe binden an T-Zell-Rezeptoren einer bestimmten Spezifität, die durch das MHC Allel sowie die Peptidsequenz determiniert wird. MHC Klasse I-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse I Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander

verknüpft sind. Der Komplex wird über konjugiertes R-PE im Durchflußzytometer visualisiert. Die Methode beruht auf der Wechselwirkung des antigen-spezifischen T-Zellrezeptors mit den Peptid-beladenen MHC Klasse I Komplexen.

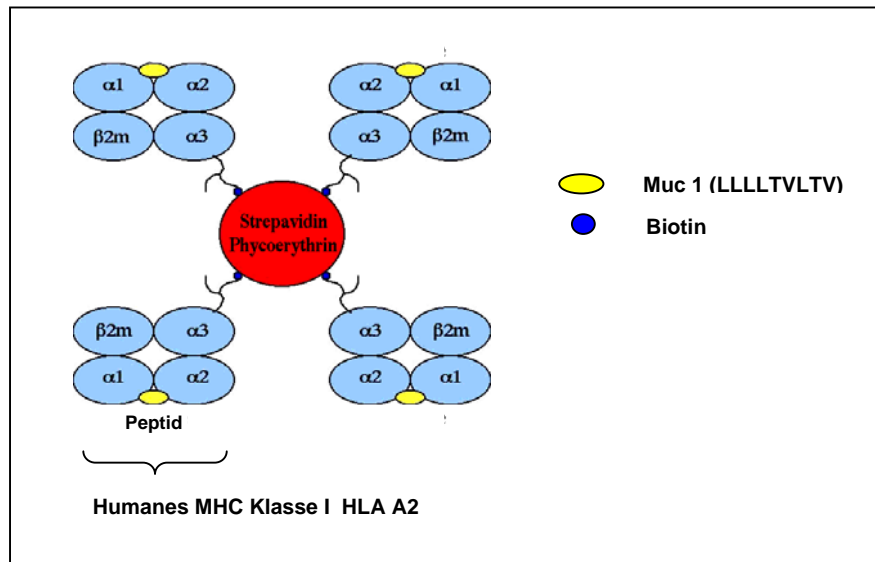


Abb. 3 Schematische Darstellung eines MHC Klasse I Tetramers. Tetramere Komplexe aus je vier MHC Klasse I Molekülen (hier: humanes HLA-A2) und Peptiden (hier: LLLLTVLTV, MUC1) sind über Biotin und Streptavidin miteinander verbunden. Das Tetramer wird über Phycoerythrin im Durchflußzytometer visualisiert. Übernommen von Altman und Safrit, HIV Molecular Immunology Database.

Zum Nachweis MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen bei MM Patienten wurden Tetramere eingesetzt, die aus MUC-1(LLLLTVLTV)-Peptid präsentierenden MHC HLA-A*0201-Komplexen zusammengesetzt waren.

Die Zellen aus Blut und Knochenmark HLA-A*0201-positiver MM-Patienten wurden mit Tetramer und Fluoreszenz-markiertem CD8 Antikörper angefärbt. Tote Zellen wurden durch die Inkorporation von zugegebenem Propidiumjodid (PI) detektiert und von der Analyse ausgegrenzt.

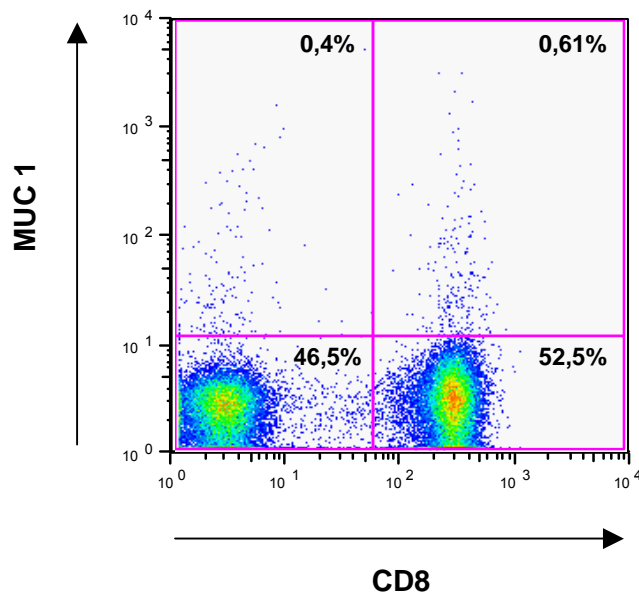


Abb. 4 Identifizierung MUC-1 peptidspezifischer CD8 T-Zellen durch Tetramerfärbung. PBMZ von HLA-A*0201 positiven Plasmazytom-Patienten wurden mit HLA-A*0201 MUC-1 Peptid-Tetrameren gefärbt. Tote, Propidiumjodid (PI) positive Zellen wurden zuvor ausgegrenzt. Dargestellt ist der Anteil MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen innerhalb der gesamten vitalen Lymphozytenpopulation eines exemplarisch ausgewählten Patienten mit MM in einem Punktdiagramm.

In Abb. 4 sind MUC-1 peptidspezifische CD8 Blut T-Zellen eines MM Patienten dargestellt. CD8⁺/Tetramer⁺ Zellen sind als MUC-1 peptidspezifisch anzusehen. Dagegen sind CD8-negative Tetramer-positive Zellen auf eine unspezifische Bindung des Tetramers zurückzuführen. Es konnte in mehreren Experimenten gezeigt werden, dass es sich hierbei um Plasmazellen (CD38⁺, CD138⁺) bzw. B-Zellen (CD19⁺) handelt (eigene, nicht gezeigte Experimente). Eine solche Tetramerbindung könnte dabei durch peptidunspezifische Wechselwirkungen mit Fc-Rezeptoren oder Oberflächen-gebundenen Immunglobulinen hervorgerufen werden.

Insgesamt wurden Blut- und Knochenmark-Proben von je 42 und 16 HLA-A*0201 positiven MM Patienten (P) sowie 15 bzw. 5 Proben HLA-A*0201 positiver, gesunder Donoren (D) verglichen. Die Frequenzen sind in Abb. 4 zusammengefasst.

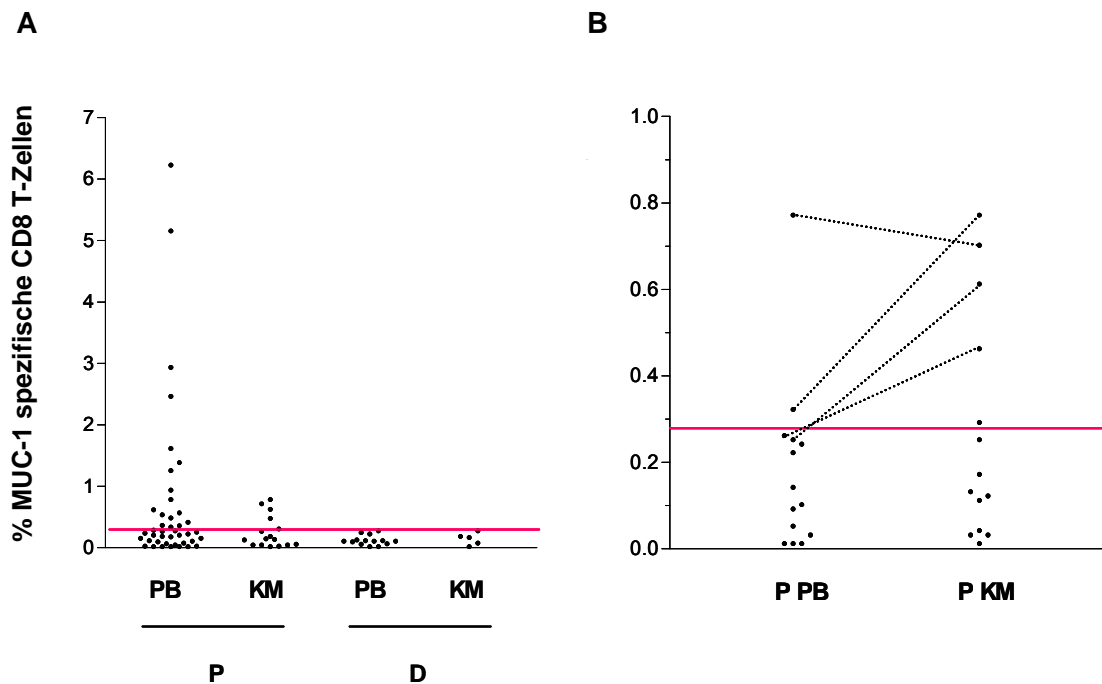


Abb. 5 Evaluation MUC-1 peptidspezifischer CD8 T-Zellen in Blut und Knochenmark.

Zellen von HLA-A*0201 positiven Plasmazytom-Patienten oder gesunden Spendern wurden mit HLA-A*0201 MUC-1 Peptid-Tetrameren gefärbt. Tote, Propidiumjodid (PI) positive Zellen wurden zuvor ausgegrenzt. **A**, Prozentzahlen von MUC-1 spezifischen Zellen innerhalb der gesamten CD8 T-Zell-Population in peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) von Patienten mit MM (P; n = 42 für PB, n = 16 für KM) und von gesunden Donoren (D; n = 15 für PB, n = 5 für KM). **B**, Prozentzahlen MUC-1 spezifischer Zellen innerhalb der gesamten CD8 T-Zell-Population von Patienten mit MM; gezeigt sind ausschließlich zusammengehörende Paare (.....) aus peripherem Blut und Knochenmark, deren Frequenz oberhalb von 0,28% lagen. Die rote Linie indiziert den Maximalwert MUC-1 peptidspezifischer T-Zellen bei gesunden Spendern.

Abb. 5 A gibt das allgemeine Vorkommen und die Frequenz Tetramer-spezifischer CD8 T-Zellen in Blut und Knochenmark wieder. Bei den untersuchten Patienten wurden im peripheren Blut 0 – 6,21% und im Knochenmark 0 – 0,77% MUC-1 peptidspezifische CD8 T-Zellen detektiert. Dagegen wurde im Blut und im Knochenmark von gesunden Donoren eine Frequenz von 0 – 0,26% bzw. 0 – 0,28% Tetramer-spezifischen CD8 T-Zellen nachgewiesen.

Der geringe Anteil Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen in den Donoren stellt ein natürliches Vorkommen dieser Zellen in gesunden Spendern dar und wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben (Pittet et al. 1999, Dunbar et al. 2000).

Im Blut von MM-Patienten (n = 42) konnte eine signifikant höhere Frequenz MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen demonstriert werden (p = 0,003). Die durchschnittliche

Frequenz betrug 1,54%. Dabei kam in 17 von 42 Patienten eine zum Teil sehr starke Erhöhung der Frequenzen vor im Vergleich zu den Werten bei gesunden Spendern.

Im Knochenmark wurde in 5 von 16 untersuchten Patienten (~ 31%) ein erhöhtes Vorkommen Tetramer-spezifischer CD8 T-Zellen detektiert mit einer durchschnittlichen Frequenz von 0,57%.

Um die Verteilung MUC-1 peptidspezifischer CD8 T-Zellen in Blut und Knochenmark von MM-Patienten miteinander vergleichen zu können, wurden in Abb. 5 B ausschließlich zusammengehörende Paare (—) aus Blut und Knochenmark (n = 14) aufgelistet. Auch hier wurden nur jene Frequenzen berücksichtigt, die über 0,28% lagen.

In 2 von 14 Fällen (~ 14%) konnte im Blut ein erhöhtes Vorkommen Tetramer-spezifischer CD8 T-Zellen detektiert werden. Die durchschnittliche Frequenz lag hier bei 0,55%. Im Knochenmark wurde in 5 von 14 Patienten (~ 36%) eine erhöhte Anzahl MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen nachgewiesen. Hier lag die durchschnittliche Frequenz bei 0,57%. Vergleicht man die Frequenzwerte dieser fünf Knochenmarkproben mit denen zugehöriger, autologer Blutproben, so scheinen mit einer tendenziellen Signifikanz ($p=0,078$) im Knochenmark mehr MUC-1 peptidspezifische T-Zellen vorzukommen als im Blut.

4.1.2 Nachweis MUC 1-reaktiver Gedächtnis T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom

Das funktionelle Potential dieser Zellen sollte *in vitro* mit Hilfe des ELISpot-Tests untersucht werden.

Der ELISpot-Test stellt eine hochsensitive Methode dar, um einzelne Antigen-spezifische T-Zellen innerhalb einer T-Zellpopulation direkt zu detektieren und zu quantifizieren.

Um ausschließlich Gedächtnis-T-Zell-Antworten zu untersuchen, wurden die T-Zellen in einer 40-stündigen *in vitro* Kurzzeit-Stimulation mit MUC-1(LLLLTVLTV) Peptid-präsentierenden autologen Dendritischen Zellen inkubiert. MUC-1 peptidspezifische T-Zellen wurden auf IFN- γ Zytokin-Produktion getestet. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen mit Insulin(HLVEALYLV) Peptid-präsentierenden autologen Dendritischen Zellen inkubiert. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemessen.

Die Reaktivität MUC-1 spezifischer T-Zellen wurde für Knochenmark und Blut in insgesamt 14 bzw. 6 HLA-A*0201 positiven Plasmozytom-Patienten untersucht.

Die untersuchten Patienten wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der IFN- γ produzierenden Zellen auffällig höher lag als die der Negativkontrolle ($p \leq 0,1$).

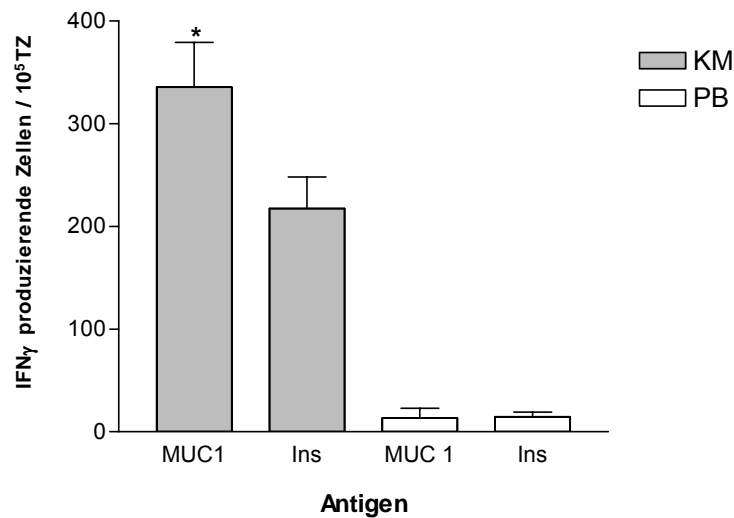


Abb. 6 Analyse MUC-1 reaktiver Gedächtnis T-Zellen anhand des ELISpot-Tests. Dargestellt ist die Anzahl IFN- γ produzierender T-Zellen aus dem Peripheren Blut (PB) oder Knochenmark (KM) von Plasmazytom-Patienten. T-Zellen wurden mit autologen MUC-1 bzw. Insulin (Ins) Peptid-präsentierenden Dendritischen Zellen stimuliert. *, die Anzahl reaktiver T-Zellen ist auffällig höher ($p \leq 0,1$) als in der Negativkontrolle. Es ist die Anzahl reaktiver T-Zellen (Mittelwert aus Triplikaten mit Standardabweichung) dargestellt für eine Gesamtzahl von 10^5 T-Zellen pro Loch. Die Frequenz der MUC-1 reaktiven KM T-Zellen betrug hier $f = 1/847$.

In Abb. 6 ist exemplarisch das Elispot-Ergebnis eines immunologisch reaktiven Patienten dargestellt. Hier wurden nur im Knochenmark signifikant ($p=0,009$) MUC-1 reaktive T-Zellen gefunden mit einer Frequenz von $1/847$.

Von insgesamt 14 untersuchten Knochenmarkproben konnten in 5 Plasmazytom-Patienten (36%) MUC-1 reaktive Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen werden. Im Blut fanden sich solche Zellen dagegen nur in 1 von 6 getesteten Patienten (17%).

In Tabelle 1 sind die Frequenzen MUC-1 reaktiver T-Zellen aus Knochenmark und Blut zusammengefasst. Es wurden nur Frequenzen MUC-1 reaktiver Patienten angegeben.

Patient	TZ Frequenzen	
	KM	PB
# 494	1 : 730 p = 0,0036	1 : 980 p = 0,0061
# 554	1 : 3448 p = 0,1	—
# 586	1 : 3571 p = 0,0779	X
# 598	1 : 847 p = 0,0093	—
# 600	1 : 800 p = 0,0029	X

Tabelle 1 Frequenzen MUC-1 reaktiver T-Zellen in Patienten mit MM. Dargestellt sind die Frequenzen MUC-1 reaktiver T-Zellen von MM Patienten innerhalb der gesamten T-Zellpopulation in peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM). Es wurden nur Frequenzen MUC-1 reaktiver Patienten angegeben. Es wurden Knochenmark und Blut von insgesamt 14 bzw. 6 HLA-A*0201 positiven Plasmazytom-Patienten untersucht. Frequenzen immunologisch reaktiver Patienten wurden angegeben, Immunologische Reaktivität wurde angenommen, wenn die Zahl reaktiver T-Zellen auffällig höher ($p \leq 0,1$) lag als irrelevantes Kontrollpeptid. —, es wurden keine signifikant MUC-1 reaktiven T-Zellen gefunden; X, wurde nicht untersucht.

Folglich enthalten viele MM Patienten MUC-1 peptidspezifische Gedächtnis T-Zellen, die nach Reaktivierung IFN- γ sezernieren.

4.1.3 Identifizierung zytotoxischer MUC 1-reaktiver Gedächtnis T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom

Als Nächstes wurde untersucht, ob MUC-1 spezifische Gedächtnis T-Zellen aus Plasmazytom-Patienten in der Lage sind, eine spezifische, zytotoxische Immunantwort zu generieren. Die zytotoxische Aktivität reaktiver T-Zellen wurde mit Hilfe des $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungstest analysiert. Der Test basiert auf der Bestimmung von freigesetztem radioaktivem Chrom abgetöteter $^{51}\text{Chrom}$ -markierter Zielzellen durch aktivierte zytotoxische Effektor-T-Zellen.

T-Zellen aus Blut und Knochenmark wurden für 7 – 8 Tage mit autologen MUC-1(LLLLTVLTV) Peptid-präsentierenden Dendritischen Zellen stimuliert. Am Versuchstag wurden MUC-1Peptid- bzw. als Negativkontrolle Insulin(HLVEALYLV) Peptid-präsentierende K562-Tumorzellen mit radioaktivem Chrom markiert und mit den generierten Effektor-T-Zellen ko-inkubiert. Effektor- und Zielzellen wurden dabei in Verhältnissen von 50:1 bis 3:1 eingesetzt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Es wurden insgesamt 5 HLA-A*0201 positive Plasmazytom-Patienten untersucht.

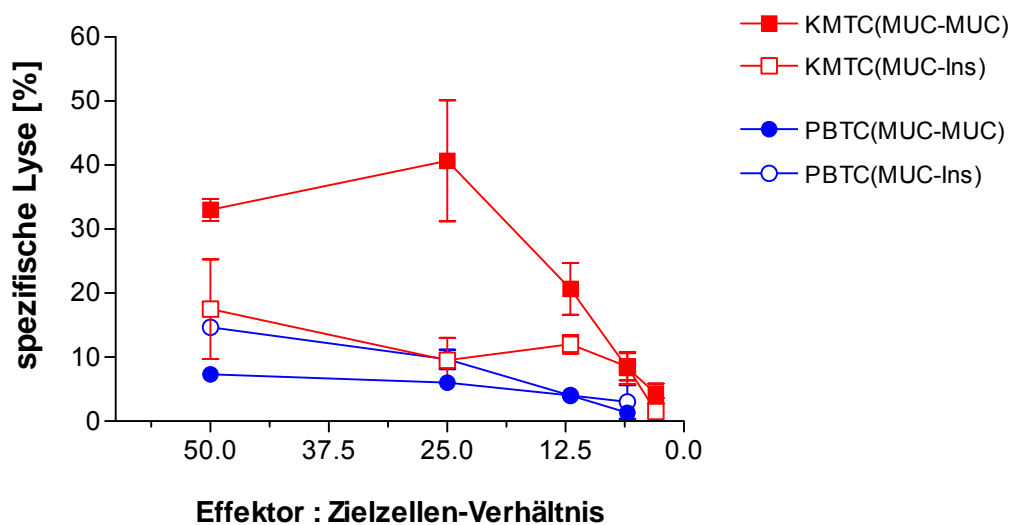


Abb. 7 Zytotoxische Aktivität MUC-1 spezifischer T-Zellen bei Patienten mit MM. Dargestellt ist die spezifische Lyse in Prozent gegenüber Effektor zu Zielzellen Verhältnisse (E:Z) in einem Kurvendiagramm. E, T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) von HLA-A*0201 positiven Plasmazytom-Patienten generiert nach Stimulation mit autologen MUC-1 Peptid-präsentierenden Dendritischen Zellen; Z, MUC-1 oder Insulin (Ins) Peptid-präsentierende K562-Zellen. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Es sind gemittelte Werte mit Standardabweichungen eines repräsentativen von fünf Zytotoxizitäts-Experimenten abgebildet.

Die Analyse der Zytotoxizität MUC-1 spezifischer T-Zellen ergab, dass eine MUC-1 gerichtete zytotoxische Reaktivität in multiplen Myelom-Patienten induziert werden konnte (Abb. 7). In 3 von 5 untersuchten Patienten zeigten reaktivierte Effektor-T-Zellen aus dem Knochenmark eine MUC-1 peptidspezifische Lyse der Zielzellen (8 - 41% Lyse). Die MUC-1 gerichtete Zytotoxizität war dabei signifikant höher ($p = 0,003$) als die Lyse Insulin Peptid-präsentierender K562-Kontrollzellen.

Dagegen waren T-Zellen aus dem Blut nicht in der Lage, eine signifikante MUC-1 spezifische zytotoxische Reaktivität zu generieren. Hier konnte in keinem der 5 untersuchten Patienten ein signifikanter Unterschied in der Lyse von MUC-1 und Insulin Peptid-präsentierenden Zielzellen festgestellt werden.

In Abb. 7 ist ein Zytotoxizitäts-Experiment exemplarisch dargestellt.

Aus der kumulativen Auswertung aller Zytotoxizitätsexperimente ergab sich eine signifikant höhere zytotoxische Kapazität der Knochenmark-, gegenüber der Blut T-Zellen ($p = 0,037$).

Schlussfolgernd ergab die Analyse der zellvermittelten zytotoxischen Aktivität, dass ausschließlich reaktivierte T-Zellen aus dem Knochenmark – jedoch nicht aus dem Blut – eine signifikante MUC-1 gerichtete Zytotoxizität in Plasmozytom-Patienten induzieren konnten.

4.1.4 Perforin-Induktion durch MUC-1 Stimulation in zytotoxischen Effektor-T-Zellen aus Blut und Knochenmark bei MM-Patienten

Da die Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen auf der Wirkung sekretierter Effektormoleküle beruht, wurde untersucht, ob Perforin, als Vertreter der Zytotoxine, in MUC-1 stimulierten T-Zellen aus Plasmozytom-Patienten induziert wird.

T-Zellen aus Blut und Knochenmark wurden unter den selben Bedingungen wie bei den Zytotoxizitäts-Experimenten für 7 Tage mit autologen MUC-1(LLLTVLTV) Peptid-präsentierenden Dendritischen Zellen stimuliert. Am Versuchstag wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD8, CD45RA sowie Perforin gefärbt und im Durchflußzytometer untersucht. CD8 positive Lymphozyten wurden eingegrenzt und analysiert. Es wurden insgesamt 5 HLA-A*0201 positive Plasmozytom-Patienten getestet. In 2 von 5 Patienten wurden nur Blutproben untersucht und gegen CD8 und Perforin gefärbt.

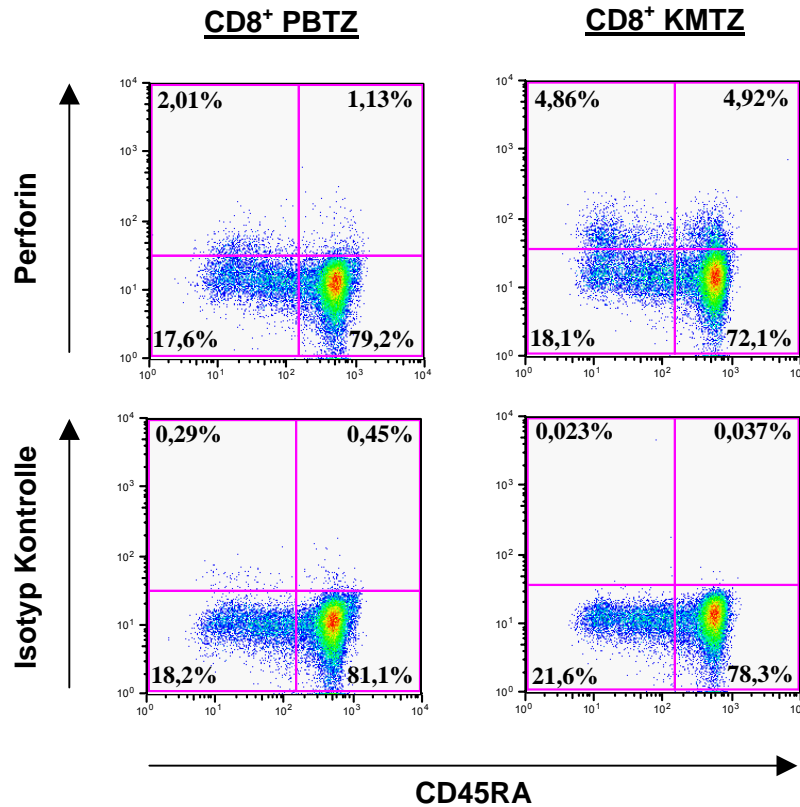


Abb. 8 Perforin-Induktion in MUC-1 reaktiven Effektor-T-Zellen aus Patienten mit MM. Dargestellt ist der Perforin-Gehalt von CD8 positiven T-Lymphozyten eines exemplarischen von insgesamt drei MM Patienten gegen die Expression von CD45RA als Marker für naive bzw. Effektor Zellen in einem Punktediagramm. T-Zellen aus Blut (PBTZ) und Knochenmark (KMTZ) wurden mit autologen MUC-1 Peptid-präsentierenden Dendritischen Zellen stimuliert und auf ihren Perforin-Gehalt untersucht.

Eine Induktion von Perforin konnte in allen fünf der fünf untersuchten Plasmozytom-Patienten detektiert werden. In Abbildung 8 ist ein Experiment exemplarisch dargestellt.

	Perforin Produktion [%]			
Patient Nr.	PB		KM	
	CD45RA ⁺	CD45RA ⁻	CD45RA ⁺	CD45RA ⁻
# 1	0,86	8,68	6,34	21,06
# 2	2,67	5,92	4,59	8,94
# 3	0,29	3,61	0,99	8,36

Tab. 2 Perforin-Induktion in naiven und Gedächtnis CD8 T-Zellen aus MM Patienten nach MUC-1 Stimulation. Dargestellt ist eine Zusammenfassung der Anteile [%] Perforin-produzierender CD8 T-Zellen innerhalb von naiven bzw. Effektor und Gedächtnis T-Zellen (TZ) aus Blut (PB) und Knochenmark (KM) abzüglich der Isotyp Kontrolle aus 3 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 2 fasst die prozentuale Verteilung Perforin-produzierender CD8 T-Zellen aus Blut und Knochenmark von drei Patienten innerhalb der naiven bzw. Effektor und Gedächtnis Zellpopulation zusammen. In allen drei getesteten Patienten konnten in beiden Kompartimenten Perforin-produzierende MUC-1 reaktive Effektor-T-Zellen nachgewiesen werden. Die Anzahl Perforin-produzierender T-Zellen lag im KM verglichen zum Blut signifikant höher ($p=0,03$). Berücksichtigt man die unterschiedlichen Zahlen vorliegender naiver bzw. Effektor und Gedächtnis T-Zellen, so findet man eine signifikante ($p=0,012$) Anreicherung Perforin-produzierender Zellen innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation in beiden Kompartimenten.

4.1.5 Nachweis einer Ko-Lokalisation von CD8 T-Zellen und MUC-1 exprimierenden Zellen in Gefrierschnitten von Knochenmark-Stanzen von MM-Patienten

Aufgrund der Identifizierung MUC-1 peptidspezifischer T-Zellen bei Plasmozytom-Patienten, die sich *in vitro* spezifisch zu IFN- γ produzierenden und zytotoxischen Effektor-T-Zellen reaktivieren lassen, wurde untersucht, ob Ko-Lokalisationen von CD8 T-Zellen und MUC-1 exprimierenden Zellen im Knochenmarksgewebe von MM-Patienten auftreten. Als Untersuchungsmethode diente die immunhistologische Färbung, mit der man das Verteilungsmuster sowie die Expressionstärke von Molekülen in einem Gewebeschnitt ermitteln kann.

Aus schockgefrorenen Knochenmarkstanzen von drei Patienten mit MM wurden 5 – 7 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt, die gegen MUC-1 und CD8 gefärbt wurden.

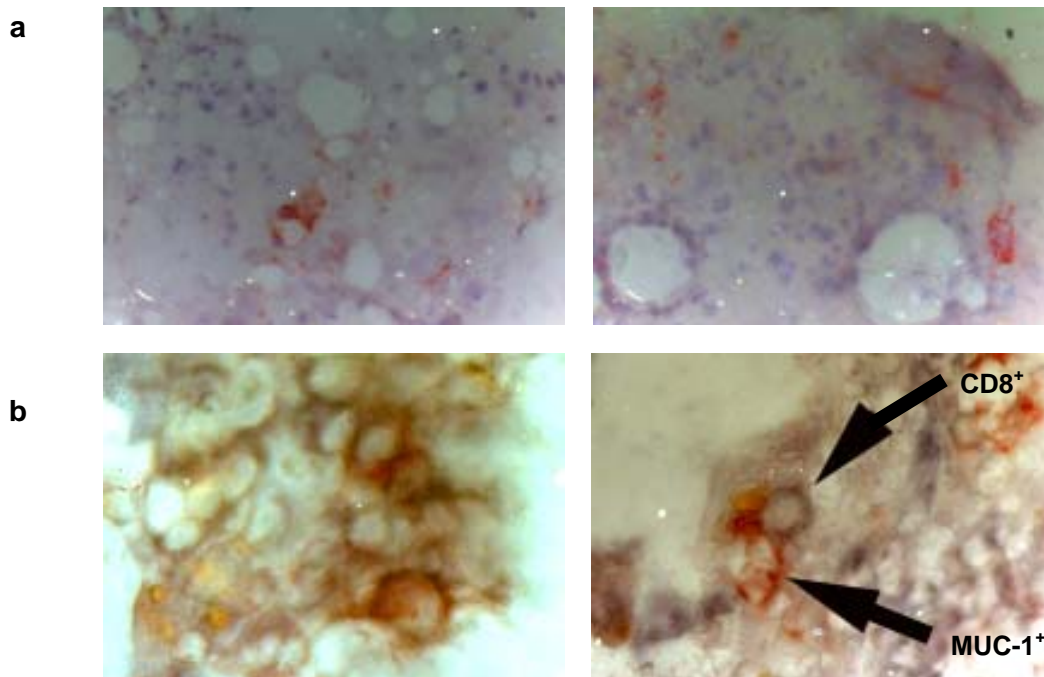


Abb 9 Immunhistologische Analyse von Gefrierschnitten von Knochenmark-Stanzen aus MM-Patienten. Es sind 5-7 μ m dicke Gefrierschnitte von Knochenmarkstanzen dargestellt; a, MUC-1 gefärbte Zellen (rot) gegengefärbt mit Hämalaun (blau). 100-fache Vergrößerung; b, Pfeile indizieren MUC-1 (rot) und CD8 (dunkelblau) gefärbte Zellen. 400-fache Vergrößerung.

Die MUC-1 gefärbten und Hämalun gegengefärbten Gefrierschnitte (Abb. 9 a) der Knochenmarkstanzen geben die allgemeine Verteilung und Expression von MUC-1 im Knochenmarkgewebe multipler Myelom-Patienten wieder. Die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalun dient dazu, die Histomorphologie des Knochenmarkgewebes kontrastiert wiederzugeben.

Die MUC-1 und CD8 gefärbten Gefrierschnitte (Abb. 9 b) der Knochenmarkstanzen belegen eine Ko-Lokalisation von CD8 T-Zellen (dunkelblau gefärbte Zellen) und MUC-1 exprimierenden Zellen (rot gefärbte Zellen) *in situ*. Die Größe und Form der MUC-1 gefärbten Zellen entspricht dabei eher Plasmazytom-Zellen als Erythroblasten, die bekanntlich ebenfalls, wenngleich in geringerem Maße MUC-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Brugger 1999).

Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass auch *in vivo* MUC-1 spezifische CD8 T-Zellen MUC-1 positive Plasmazytom-Zellen erkennen und spezifische Effektorantworten auslösen können.

Somit konnte ebenfalls für eine hämatologische Neoplasie wie dem Multiplem Myelom eine Generierung Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen im Verlauf einer Tumorerkrankung mit Anreicherung im Knochenmark nachgewiesen werden, wie es bereits zuvor für solide Tumoren gezeigt wurde (Feurerer et al. 2001b, Letsch et al. 2003).

4.2 Charakterisierung reaktiver T-Zellen in funktionalen T-Zell Experimenten

4.2.1 Anreicherung Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen in der Effektor Gedächtnis Zellpopulation beim Mammakarzinom

Mögliche Ursachen für beobachtete Unterschiede in der Anti-Tumor Reaktivität zwischen Tumor-spezifischen T-Zellen aus dem Blut und Knochenmark beim Mammakarzinom könnten in phänotypischen und/oder funktionalen Differenzen der Tumor-spezifischen T-Zellen aus PB und KM begründet liegen. In diesem Abschnitt wurden Tumor-spezifische T-Zellen aus PB und KM zunächst auf verschiedene phänotypische Merkmale geprüft und auf funktionale Differenzen (siehe 4.2.4) untersucht.

Es sollte geklärt werden, ob sich Blut- bzw. Knochenmark-stämmige Tumor-spezifische T-Zellen aus unterschiedlichen T-Zellsubpopulationen zusammensetzen. Um ihre Verteilung innerhalb der T-Gedächtnis Subpopulationen zu untersuchen, wurde die Expression der phänotypischen Marker CD45RA und CD62L in Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen analysiert.

Zellen aus PB und KM HLA-A2 positiver Mammakarzinom-Patienten mit Primärtumoren wurden mit Fluoreszenz-markierten Tetrameren und Antikörpern gegen CD8, CD45RA und CD62L gefärbt. Die eingesetzten Tetramere enthielten Komplexe aus MHC Klasse I HLA-A*0201 Molekülen und Peptiden aus den Tumor-spezifischen Proteinen MUC-1 (LLLLTVLTV) oder Her-2/neu (KIFGSLAFL) bzw. als Negativkontrolle irrelevantes Peptid HIV gag (SLYNTVATL). Des weiteren wurden zur Kontrolle Zellen aus PB und KM gesunder HLA-A2 positiver Donoren mit MUC-1 bzw. Her-2/neu Tetrameren gefärbt. Tote Zellen wurden durch die Inkorporation von zugegebenem Propidiumjodid (PI) detektiert und von der Analyse ausgegrenzt. Die vitale Lymphozytenpopulation wurde eingegrenzt und analysiert.

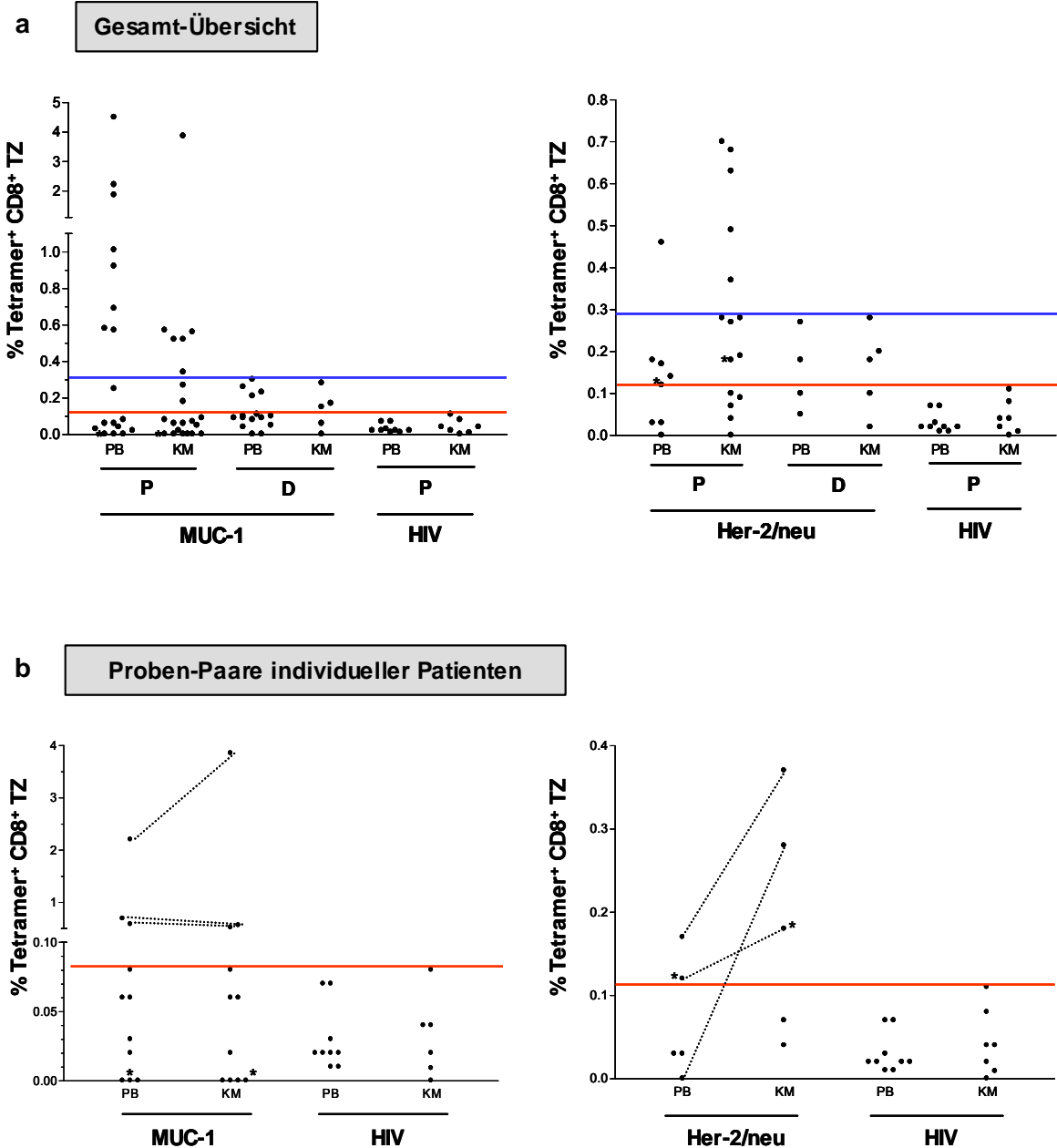


Abb. 10 Nachweis MUC-1 bzw. Her-2/neu peptidspezifischer CD8 T-Zellen in PB und BM von Patienten mit Mammakarzinom. Dargestellt sind die Frequenzen [%] Tetramer-positiver CD8 T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) von HLA-A2 positiven Brustkrebs-Patienten (P) sowie gesunden Donoren (D) in einem Punktediagramm. Eingesetzt wurden HLA-A*0201 MUC-1 und Her-2/neu bzw. HIV Peptid-Tetramere als Negativkontrolle. Tote, Propidiumjodid (PI) positive Zellen wurden zuvor ausgegrenzt. Frequenzen **a)** Tetramer-positiver CD8 T-Zellen aller untersuchten PB (MUC-1: n(P) = 18 und n(D) = 15; Her-2/neu: n(P) = 8 und n(D) = 5; HIV: n(P) = 9) und KM Proben (MUC-1: n(P) = 21 und n(D) = 5; Her-2/neu: n(P) = 15 und n(D) = 5; HIV: n(P) = 7), **b)** Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen von zusammengehörigen (.....) PB und KM Paaren (MUC-1: n = 11; Her-2/neu: n = 5). Die rote Linie markiert den Maximalwert von HIV Peptid-Tetramer positiven CD8 Patienten-T-Zellen und die blaue Linie den Maximalwert von MUC-1 bzw. Her-2/neu Peptid-Tetramer positiven CD8 Donor-T-Zellen. *, Mammakarzinom-Patientin mit neo-adjuvanter Chemotherapie.

In Abb. 10 sind zunächst das allgemeine Vorkommen und die Frequenzen Tetramerspezifischer CD8 T-Zellen in Blut und Knochenmark von Mammakarzinom-Patienten und gesunden Donoren dargestellt. Abb. 10 a) gibt die Gesamtheit aller Tetramer-Frequenzen für alle untersuchten PB und KM Proben wieder. Abb. 10 b) listet dagegen nur die Frequenzen Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen von zusammengehörigen PB und KM Paaren auf. Die Frequenzen MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen in der Gesamtheit der untersuchten Patienten (Abb. 10 a) betrugen im peripheren Blut 0 – 4,49% und im Knochenmark 0 – 3,85%. Dagegen wurde im Blut und im Knochenmark von gesunden Donoren nur eine Frequenz von 0 – 0,26% bzw. 0 – 0,28% MUC-1 positiver CD8 T-Zellen gemessen.

Der Anteil Her-2/neu spezifischer CD8 T-Zellen in der Gesamtheit der untersuchten Patienten lag im Blut bei 0 – 0,46% und im Knochenmark bei 0 – 0,7%. Im Blut und Knochenmark von gesunden Donoren wurden Frequenzen von 0 – 0,35% bzw. 0 – 0,28% an Her-2/neu positiven CD8 T-Zellen nachgewiesen.

Der Anteil an CD8 T-Zellen, der irrelevantes Peptid HIV gag im Kontext mit HLA-A2-Molekülen gebunden hatte, lag im Blut bei 0,01 – 0,07% und im Knochenmark bei 0 – 0,11%. Die farbigen Linien markieren die maximalen Werte der Negativkontrollen: Tumorspezifische CD8 T-Zellen in den untersuchten gesunden Donoren (blau) bzw. HIV gag-positive CD8 T-Zellen in den untersuchten Patienten (rot).

Der geringe Anteil Tumorspezifischer CD8 T-Zellen im PB und KM von Donoren scheint ein natürliches Vorkommen dieser Zellen in gesunden Spendern widerzuspiegeln und wurde ebenfalls in der Literatur beschrieben (Pittet 1999, Dunbar 2000). MUC-1 und Her-2/neu sind zwar tumorassoziierte Antigene, werden allerdings ebenfalls von gesundem epitheliale Gewebe exprimiert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass man eine geringe Expression beider Antigene auch in gesunden Donoren findet.

Aus diesem Grund wurden nur die Frequenzen der HIV gag-positiven CD8 T-Zellen als unspezifisches Hintergrundrauschen gewertet und damit nur die Frequenzen der Tumorspezifischen CD8 T-Zellen oberhalb der roten Linie zur Analyse herangezogen.

Wie aus Abb. 10 a) hervorgeht, kommen in Patienten Tumorspezifische CD8 T-Zellen vor, die im Vergleich zu gesunden Spendern eindeutig höhere Frequenzen (4,49% versus 0,28%) aufweisen. Im Fall von MUC-1 wurde ein Anstieg MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen sowohl im PB als auch im KM von Patienten nachgewiesen. Dagegen konnte im Vergleich zu gesunden Spendern eine signifikante, jedoch geringere Erhöhung an Her-2/neu-spezifischen CD8 T-Zellen nur im KM jedoch, mit einer Ausnahme, nicht im PB von Patienten beobachtet werden. Dies könnte allerdings an der geringeren Zahl untersuchter Blutproben liegen (n = 8 für PB versus n = 15 für KM).

Um die Frequenzen Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen in PB und KM der Patienten direkt miteinander vergleichen zu können, wurden nur die Frequenzen zusammengehöriger Paare aus PB und KM aufgelistet (Abb. 10 b). Der Anteil MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen in PB und KM der untersuchten Patienten wies keine wesentlichen Unterschiede auf, bis auf eine Ausnahme, bei der im KM eine höhere Frequenz MUC-1 positiver CD8 T-Zellen detektiert wurde (3,85% für KM versus 2,2% für PB). Im Gegensatz dazu konnte in allen untersuchten Patienten ein zahlenmäßiger Anstieg Her-2/neu spezifischer CD8 T-Zellen im KM verglichen zum PB beobachtet werden. In einem Patienten wurden sogar im PB keine Her-2/neu spezifischen CD8 T-Zellen detektiert, wohingegen das KM geringe Frequenzen dieser Zellen beherbergte.

Mammakarzinom-Patienten weisen demnach eine Anreicherung MUC-1 und Her-2/neu Tumor-spezifischer T-Zellen in Blut und Knochenmark verglichen mit gesunden Spendern auf, wobei beide Kompartimente ähnliche Anteile MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen beherbergen. Dagegen konnte eine höhere Anreicherung Her-2/neu spezifischer CD8 T-Zellen im Knochenmark verglichen zum Blut detektiert werden.

Als Nächstes wurde die Verteilung naiver und Gedächtnis T-Zellen innerhalb der Tumor-spezifischen CD8 T-Zellpopulation untersucht. Gedächtnis T-Zellen sind naiven Zellen in Induktion und Art der induzierten Immunantwort in vielerlei Hinsicht. Demnach könnte ein möglicher Grund für die von Feuerer et al. 2001b beobachteten funktionalen Unterschiede in der Anti-Tumor Reaktivität zwischen Tumor-spezifischen PB und KM T-Zellen, ein unterschiedliches Verhältnis von naiven zu Gedächtnis T-Zellen sein.

Innerhalb der vitalen Lymphozytenpopulation wurden CD8 positive Zellen eingegrenzt und der prozentuale Anteil CD45RA negativer (Gedächtnis) Zellen an Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen analysiert.

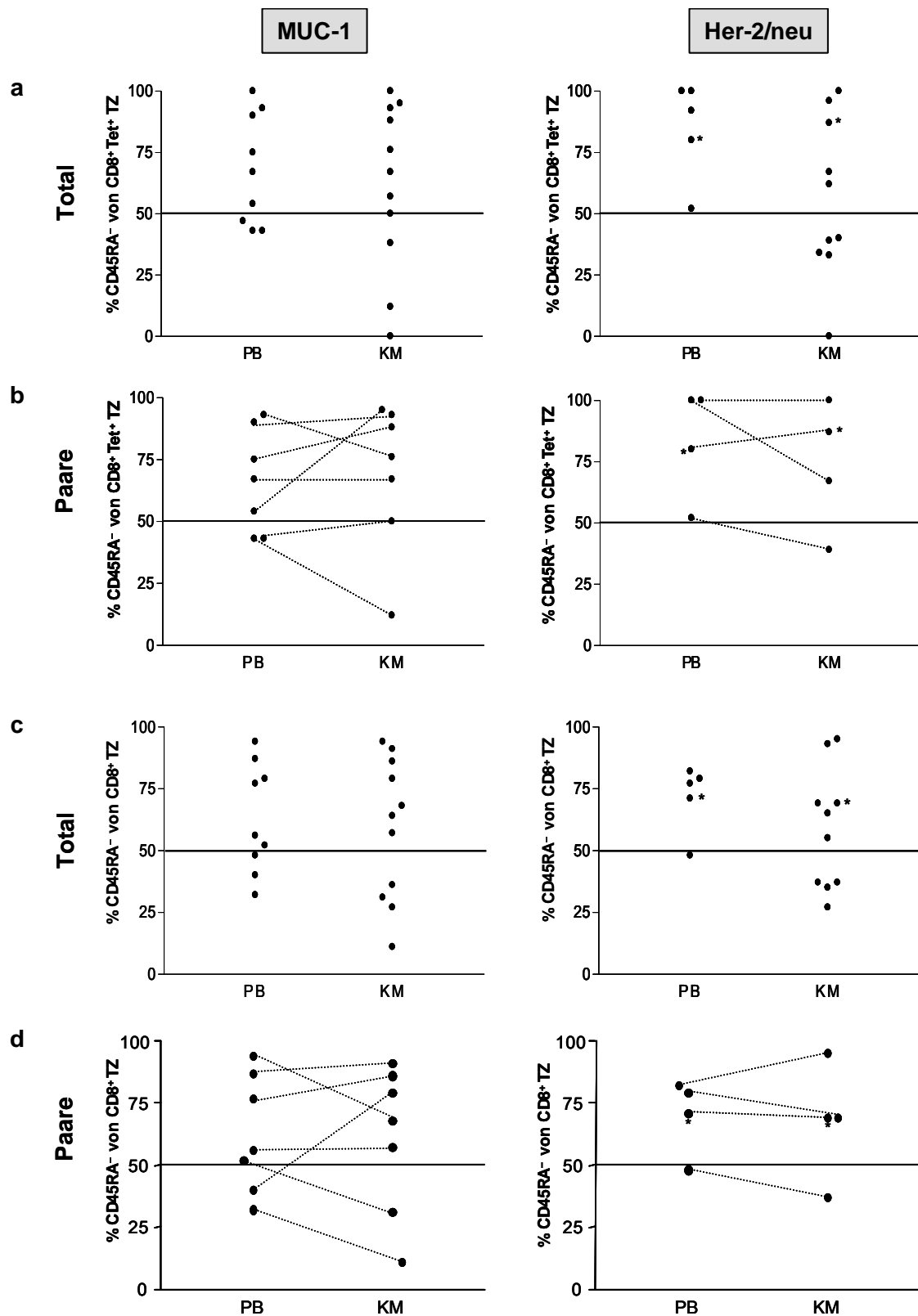


Abb. 11 Anteil von Gedächtnis Zellen an MUC-1 und Her-2/neu spezifischen CD8 T-Zellen. Dargestellt ist der Anteil [%] von CD45RA negativen Gedächtnis Zellen an Tetramer-positiven CD8 T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) von HLA-A2 positiven Brustkrebs-Patienten in einem Punktediagramm. Tote, Propidiumjodid (PI) positive Zellen wurden ausgegrenzt

und CD8 positive Lymphozyten eingegrenzt. Anteil von Gedächtnis Zellen an: **(a)** Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen aller untersuchten PB (MUC-1: n = 9; Her-2/neu: n = 5) und KM Proben (MUC-1: n = 11; Her-2/neu: n = 10), **(b)** Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen zusammengehöriger (.....) PB und KM Paare (MUC-1: n = 7; Her-2/neu: n = 4), **(c)** gesamten CD8 T-Zellen aller untersuchten PB (MUC-1: n = 9; Her-2/neu: n = 5) und KM Proben (MUC-1: n = 11; Her-2/neu: n = 10), **(d)** gesamten CD8 T-Zellen ausschließlich zusammengehöriger (.....) PB und KM Paare (MUC-1: n = 7; Her-2/neu: n = 4). *, Mammakarzinom-Patientin mit neo-adjuvanter Chemotherapie. Die schwarze Linie markiert den Wert, bei dem naive und Gedächtnis Zellen zu gleichen Anteilen vorliegen.

In Abb. 11 sind in (a) und (b) die Anteile von Gedächtnis Zellen an Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen in PB und KM dargestellt: die Gesamtheit aller untersuchten Proben bzw. zusammengehörige PB und KM Paare. Wie aus beiden Abbildungen hervorgeht, findet sich die Mehrheit der MUC-1 sowie Her-2/neu spezifischen CD8 T-Zellen in der Gedächtnis Zellpopulation wieder. Die untersuchten PB und KM Proben (a) zeigen dabei ähnliche Anteile beider Tumor-spezifischer T-Zellen. Für eine exakte Untersuchung der Unterschiede zwischen PB und KM sollten jedoch ausschließlich zusammengehörige Paare betrachtet werden (b). Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, liegt zwischen Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen aus PB und KM kein Unterschied in der Zusammensetzung aus CD45RA negativen Zellen vor.

Die allgemeine Verteilung von Gedächtniszellen innerhalb der Gesamtheit der CD8 T-Zellen aller untersuchten PB und KM Proben bzw. zusammengehöriger PB und KM Paare ist in Abb. 11 c bzw. d dargestellt. Die Gesamtheit der CD8 T-Zellen (c,d) weist eine analoge Verteilung wie Tetramer-positive CD8 T-Zellen (a,b) innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation auf mit ähnlichen Prozentzahlen an Gedächtniszellen in PB und KM.

In Tabelle 3 werden die Anteile von Gedächtniszellen an Tumor-spezifischen CD8 T-Zellen mit denen an zugehörigen Gesamt CD8 T-Zellen direkt korreliert, um mögliche Verschiebungen in der Zusammensetzung naiver zu Gedächtnis Zellen zu detektieren.

Patient	TZ Herkunft	Anteil von Gedächtniszellen an CD8 T-Zellen [%] (CD45RA ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen)			
		MUC-1 Tetramer ⁺	Total	Her-2/neu Tetramer ⁺	Total
# 340	PB	67	56	-	-
	BM	67	57	-	-
# 366	PB	-	-	52	48
	BM	-	-	39	37
# 394 *	PB	-	-	80*	71*
	BM	-	-	87*	69*
# 605	PB	-	-	100	79
	BM	-	-	67	69
# 606	PB	-	-	100	82
	BM	-	-	100	95
# 801	PB	90	87	-	-
	BM	93	91	-	-
# 860	PB	54	40	-	-
	BM	95	79	-	-
# 876	PB	75	77	-	-
	BM	88	86	-	-
# 883	PB	43	32	-	-
	BM	12	11	-	-
# 889	PB	93	94	-	-
	BM	76	68	-	-
# 920	PB	43	52	-	-
	BM	50	31	-	-

Tab. 3 Anteil von Gedächtnis Zellen an Tumor-spezifischen bzw. gesamten CD8 T-Zellen.

Dargestellt sind die Anteile [%] von CD45RA negativen Gedächtniszellen an MUC-1 bzw. Her-2/neu-spezifischen bzw. gesamten CD8 T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) von HLA-A2 positiven Mammakarzinom-Patienten. Die Zellen wurden auf CD8 positive, vitale Lymphozyten eingegrenzt. *, Mammakarzinom-Patientin mit neo-adjuvanter Chemotherapie.

Der Vergleich Tumor-spezifischer CD8 T-Zellen mit Gesamt CD8 T-Zellen bezüglich ihres Anteils an Gedächtniszellen lässt eine signifikante Anreicherung ($p=0,01$) MUC-1 spezifischer CD8 T-Zellen insbesondere für Knochenmark T-Zellen innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation erkennen. Für Her-2/neu spezifische CD8 T-Zellen konnte ebenfalls eine Anreicherung ($p=0,088$) in der Gedächtnispopulation nachgewiesen werden.

CD45RA negative Gedächtnis Zellen können in zwei Subpopulationen unterteilt werden: CD62L⁺/CCR7⁺ Zentrale Gedächtnis (CM, central memory) und CD62L⁻/CCR7⁻ Effektor Gedächtnis (EM, effector memory) T-Zellen mit unterschiedlichen Migrations- und funktionalen Eigenschaften (Sallusto et al. 1999, Masopust et al. 2001, Reinhardt et al. 2001). Um die Zusammensetzung Tumor-spezifischer CD8 Gedächtnis T-Zellen an EM und CM T-Zellen hin zu untersuchen, wurden CD8 positive, CD45RA negative, vitale Lymphozyten eingegrenzt und der prozentuale Anteil von CD62L negativen EM T-Zellen an Tumor-spezifischen CD8 Gedächtnis T-Zellen dargestellt (Abb. 12).

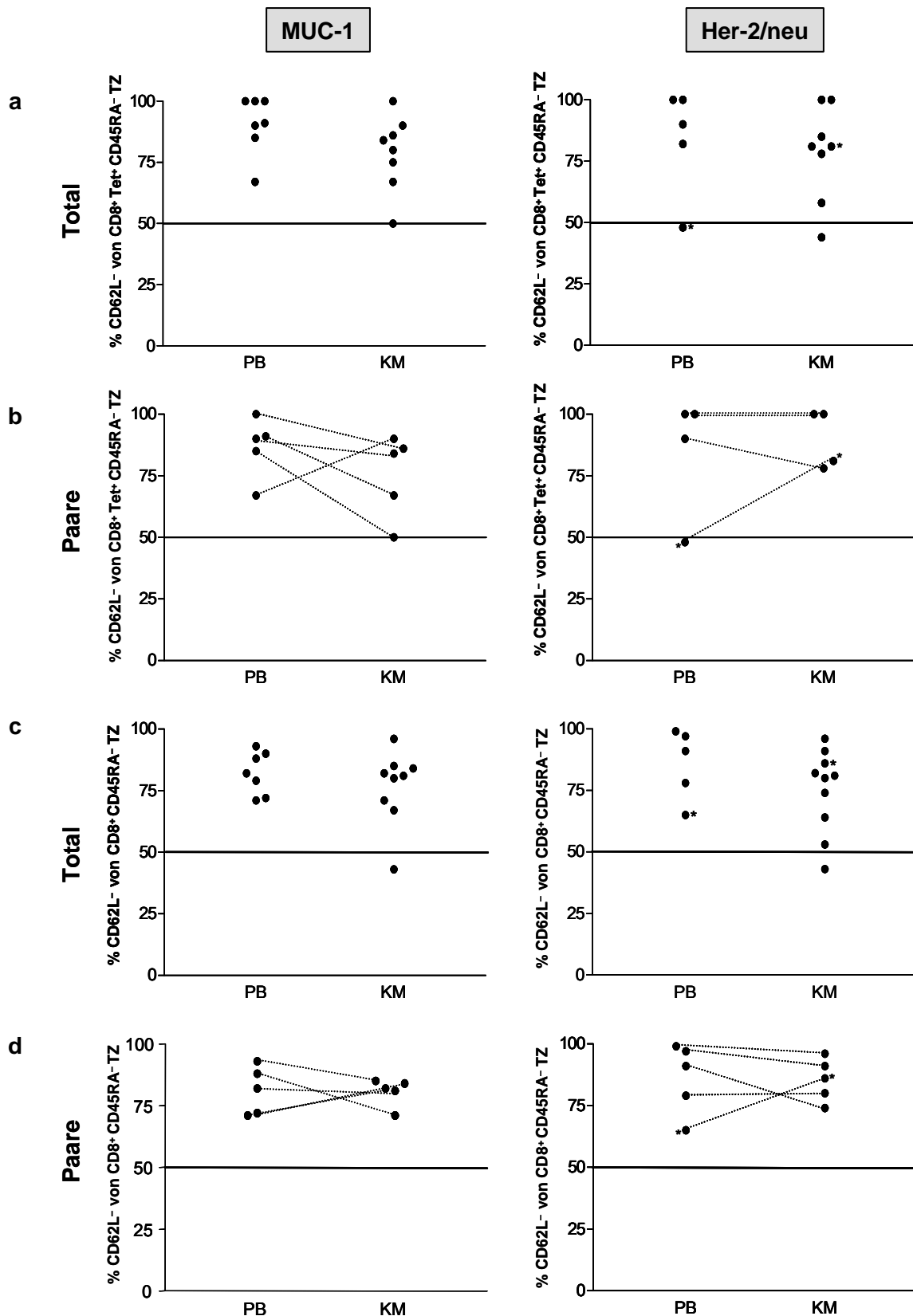


Abb. 12 Anteil von EM T-Zellen an MUC-1 und Her-2/neu spezifischen CD8 Gedächtnis T-Zellen. Dargestellt ist der Anteil [%] von CD62L negativen Effektor Gedächtnis T-Zellen (EM) an Tetramer-positiven CD8 Gedächtnis T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM)

von HLA-A2 positiven Brustkrebs-Patienten in einem Punktediagramm. Tote, Propidiumjodid (PI) positive Zellen wurden ausgegrenzt und CD8 positive/CD45RA negative Lymphozyten eingegrenzt. Anteil von EM T-Zellen an: **(a)** Tumor-spezifischen CD8 Gedächtnis T-Zellen aller untersuchten PB (MUC-1: n = 7; Her-2/neu: n = 5) und KM Proben (MUC-1: n = 8; Her-2/neu: n = 8), **(b)** Tumor-spezifischen CD8 Gedächtnis T-Zellen ausschließlich zusammengehöriger (.....) PB und KM Paare (MUC-1: n = 5; Her-2/neu: n = 4), **(c)** gesamten CD8 Gedächtnis T-Zellen aller untersuchten PB (MUC-1: n = 7; Her-2/neu: n = 5) und KM Proben (MUC-1: n = 9; Her-2/neu: n = 10), **(d)** gesamten CD8 Gedächtnis T-Zellen ausschließlich zusammengehöriger (.....) PB und KM Paare (MUC-1: n = 4; Her-2/neu: n = 5). *, Mammakarzinom-Patientin mit neo-adjuvanter Chemotherapie. Die schwarze Linie markiert den Wert, bei dem Zentrale und Effektor Gedächtnis T-Zellen zu gleichen Anteilen vorliegen.

Wie aus Abb. 12 hervorgeht, ist die überwiegende Mehrheit MUC-1 und Her-2/neu spezifischer CD8 Gedächtnis T-Zellen in der Effektor T-Gedächtnispopulation vertreten. Dies ist sowohl bei (a) allen untersuchten PB (n = 7 für MUC-1; n = 5 für Her-2/neu) und KM (n = 8 für MUC-1; n = 8 für Her-2/neu) Proben der Fall sowie bei (b) PB und KM Paaren (n = 5 für MUC-1; n = 4 für Her-2/neu). Der direkte Vergleich von PB und KM Paaren untereinander hinsichtlich ihrer EM T-Zell-Anteile an MUC-1 bzw. Her-2/neu spezifischen CD8 Gedächtnis T-Zellen (b) lässt keine wesentlichen Unterschiede erkennen.

Eine allgemeine Verteilung der EM T-Zellen innerhalb der Gesamtheit der Gedächtnis CD8 T-Zellen ist in (c) für alle untersuchten PB und KM Proben und in (d) für PB und KM Paare aufgelistet. Hier zeigt sich, dass die gesamten CD8 Gedächtnis Zellen aus PB und KM der untersuchten Patienten ebenfalls in überwiegender Mehrheit in der EM T-Zell-Population wiederzufinden ist (c,d) und sich auch hier die EM T-Zell-Anteile an CD8 Gedächtnis T-Zellen zwischen PB und KM nicht wesentlich unterscheiden (d).

Tabelle 4 gibt die Anteile von CD62L negativen (EM) T-Zellen an Tumor-spezifischen bzw. an gesamten CD8 Gedächtnis T-Zellen wieder. Dargestellt sind zusammengehörige Wertepaare, um mögliche Verschiebungen in der Zusammensetzung CM zu EM T-Zellen aufzuzeigen.

Patient	TZ Herkunft	Anteil von EM an CD8 T-Zellen [%] (CD62L ⁻ CD45RA ⁻ CD8 ⁺ T-Zellen)			
		MUC-1 Tetramer ⁺	Total	Her-2/neu Tetramer ⁺	Total
# 340	PB	91	82	-	-
	BM	67	81	-	-
# 366	PB	-	-	90	91
	BM	-	-	78	74
# 394 *	PB	-	-	48*	65*
	BM	-	-	81*	86*
# 605	PB	-	-	100	97
	BM	-	-	100	91
# 606	PB	-	-	100	99
	BM	-	-	100	96
# 860	PB	67	72	-	-
	BM	90	84	-	-
# 883	PB	85	93	-	-
	BM	50	85	-	-
# 889	PB	90	88	-	-
	BM	84	71	-	-
# 920	PB	100	71	-	-
	BM	86	82	-	-

Tab. 4 Anteil von EM T-Zellen an Tumor-spezifischen bzw. gesamten CD8 Gedächtnis T-Zellen. Dargestellt sind die Anteile [%] von CD62L negativen Effektor Gedächtnis (EM) T-Zellen an MUC-1 bzw. Her-2/neu-spezifischen bzw. gesamten CD8 Gedächtnis T-Zellen aus peripherem Blut (PB) und Knochenmark (KM) von HLA-A2 positiven Mammakarzinom-Patienten. Die Zellen wurden auf CD8 positive, CD45RA negative, vitale Lymphozyten eingegrenzt. *, Mammakarzinom-Patientin mit neo-adjuvanter Chemotherapie.

Die Korrelation der EM T-Zell-Anteile an Tumor-spezifischen CD8 Gedächtnis T-Zellen mit denen an Gesamt CD8 Gedächtniszellen lässt keine signifikante Anreicherung ($p = 0,99$) MUC-1 spezifischer, jedoch eine leichte tendenzielle Anreicherung ($p = 0,06$) Her-2/neu spezifischer CD8 Gedächtnis T-Zellen innerhalb der EM T-Zell-Subpopulation erkennen.

Folglich sind Tumor-spezifische CD8 T-Zellen in der Gedächtnis Zellpopulation und innerhalb dieser in der EM TZ-Population angereichert. Verglichen mit der gesamten CD8 T-Zellfraktion sind MUC-1 und Her-2/neu spezifische CD8 T-Zellen vor allem in der Gedächtnis Zellpopulation zu finden. Innerhalb der Gedächtniszellen konnte bei Her-2/neu spezifischen CD8 T-Zellen eine erhöhte Anreicherung in der EM T-Zell-Subpopulation beobachtet werden.

4.2.2 Anreicherung IFN- γ produzierender T-Zellen in der Effektor Gedächtnis T-Zellpopulation

In vorhergehenden Experimenten konnte eine Anreicherung von T-Zellen mit Tumorspezifischem T-Zellrezeptor in der Gedächtnis Zellpopulation von Mammakarzinom-Patienten nachgewiesen werden. Ihre Funktionalität und Tumorreaktivität konnte jedoch anhand der Tetramer-Färbungen nicht untersucht werden. Ebenso unklar ist, wie sich tumorreaktive T-Zellen aus naiven und Gedächtniszellen zusammensetzen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde eine grundsätzliche Verteilung Antigen-reaktiver T-Zellen innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation mit Hilfe des IFN- γ Sekretionstests unter Verwendung des verbreiteten Testantigens Tetanus Toxoid (TT) untersucht. Der Test ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung antigenspezifischer T-Zellen mit dem Vorteil, zusätzlich ausgewählte phänotypische Marker zu analysieren.

DZ aus peripherem Blut eines gesunden Spenders wurden für 20-25 Std. mit Tetanus Toxoid- (TT), irrelevantem Protein Endobulin- als Negativkontrolle bzw. Superantigen Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)-Protein als Positivkontrolle inkubiert und anschließend mit autologen TZ im Verhältnis 1:10 (DZ:TZ) für ca. 20 Std. co-kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern des IFN- γ Sekretions-Kits gefärbt, die sekretiertes IFN- γ direkt auf der Zelloberfläche der betreffenden Zelle binden und visualisieren. Für die phänotypische Charakterisierung wurde die Expression von CD4, CD8 und CD45RA untersucht. Die Zellen wurden im Durchflußzytometer analysiert. Tote Zellen wurden durch die Inkorporation von PI detektiert und ausgegrenzt.

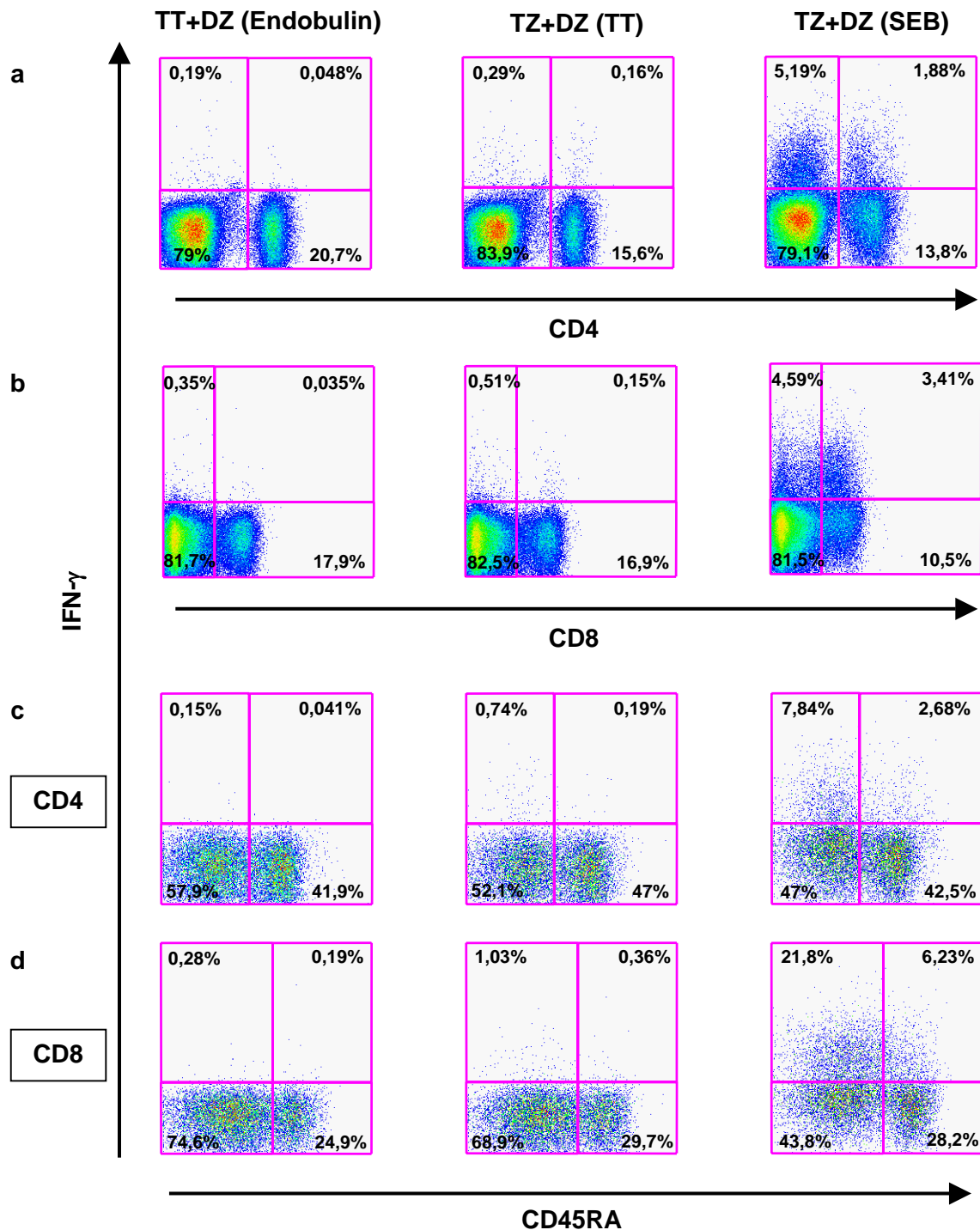


Abb. 13 IFN- γ -Sekretionsprofil verschiedener Subpopulationen Antigenreaktiver T-Zellen. Dargestellt sind Prozentzahlen IFN- γ produzierender Zellen gegen: (a) CD4 T-Zellen, (b) CD8 T-Zellen, (c) CD45RA eingegrenzter CD4 T-Zellen und (d) CD45RA eingegrenzter CD8 T-Zellen in einem Punktediagramm für unterschiedliche Stimulationsgruppen. Dendritische Zellen (DZ) eines gesunden Spenders wurden mit je 10 μ g/ml Tetanus Toxoid (TT), Endobulin als Negativkontrolle bzw. Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) als Positivkontrolle für 20-25Std. inkubiert und für ca. 20 Std. mit autologen T-Zellen (TZ) im Verhältnis 1:10 (DZ:TZ) co-kultiviert. Die Zellen wurden gegen IFN- γ , CD4, CD8 und CD45RA gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Tote, PI-positive

Zellen wurden ausgegrenzt; CD4 bzw. CD8 positive Zellen wurden ggf. eingegrenzt. Es ist eins von zwei Experimenten repräsentativ dargestellt.

Abbildung 13 gibt das IFN- γ Sekretionsprofil verschiedener Subpopulationen Antigen-reaktiver T-Zellen für unterschiedliche Stimulationsgruppen wieder. In Abb. 13 a) und b) sind die Anteile IFN- γ produzierender Zellen an CD4 bzw. CD8 T-Zellen dargestellt. Eine TT-spezifische IFN- γ Sekretion konnte sowohl in CD4 sowie CD8 T-Zellen induziert werden. Endobulin-stimulierte T-Zellen dienten als Negativkontrolle und zeigten dagegen keine IFN- γ Induktion. Eine starke Produktion von IFN- γ wurde ebenfalls in mit Superantigen SEB stimulierten T-Zellen detektiert, das als Positivkontrolle diente. SEB vermag eine relativ große Anzahl an T-Zellen durch Bindung an V β -Ketten des TZR und MHC Klasse II Molekülen von APZ zu aktivieren (V β 3, 12, 14, 15, 17 und 20) (Kotzin et al. 1993).

Um zu klären, wie stark Antigen-reaktive CD4 und CD8 T-Zellen in naiven bzw. Effektorzellen sowie Gedächtnis Zellpopulationen vertreten sind, wurden CD4 bzw. CD8 positive, vitale Lymphozyten eingegrenzt und IFN- γ positive Zellen auf Expression des naiven bzw. Effektor-Zellmarkers CD45RA hin untersucht. Wie aus Abb. 13 c+d) ersichtlich ist, sind Antigen-reaktive CD4 sowie CD8 T-Zellen viel stärker in der Gedächtnis Zellpopulation vertreten als in der naiven bzw. Effektor Zellfraktion.

Die Bedeutung der Costimulation bei einer Stimulation mit antigenpräsentierenden Dendritische Zellen ist für die Induktion einer IFN- γ Antwort durch Gedächtnis T-Zellen bisher unklar.

Aus diesem Grund wurden T-Zellen mit oder ohne costimulatorisches Signal polyklonal stimuliert und die Verteilung IFN- γ produzierender T-Zellen innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation untersucht. T-Zellen eines gesunden Spenders wurden mit anti-CD28, anti-CD3 oder anti-CD3 + anti-CD28 Antikörpern und mit Protein A für ca. 20 Std. stimuliert. Protein A kreuzvernetzt Immunglobuline durch Bindung an ihren Fc-Teil und induziert in diesem Fall eine T-Zell-Aktivierung. Im Anschluss wurden die Zellen gegen IFN- γ , CD4, CD8 und CD45RA gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt.

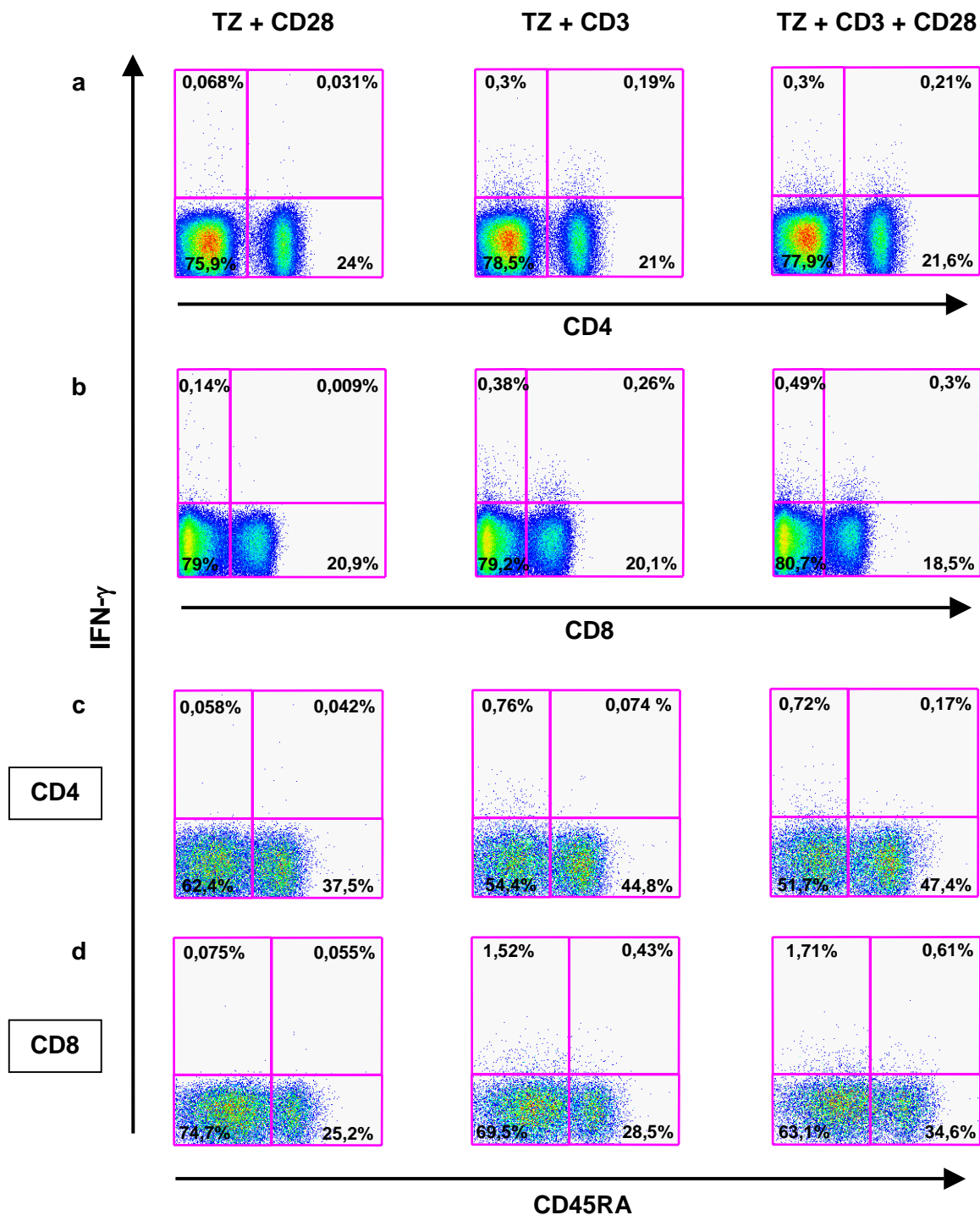


Abb. 14 IFN- γ -Sekretionsprofil verschiedener Subpopulationen Antikörper-stimulierter T-Zellen. Dargestellt sind Prozentzahlen IFN- γ produzierender Zellen gegen: (a) CD4 T-Zellen, (b) CD8 T-Zellen, (c) CD45RA eingegrenzter CD4 T-Zellen und (d) CD45RA eingegrenzter CD8 T-Zellen in einem Punktediagramm für unterschiedliche Stimulationsgruppen. T-Zellen (TZ) eines gesunden Spenders wurden mit je 0,5 $\mu\text{g/ml}$ anti-CD28, anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28 Antikörpern und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Protein A pro eingesetzten Antikörper für ca. 20 Std. stimuliert. Die Zellen wurden gegen IFN- γ , CD4, CD8 und CD45RA gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt; CD4 bzw. CD8 positive Zellen wurden ggf. eingegrenzt. Es ist eins von drei Experimenten repräsentativ dargestellt.

Wie aus Abb. 14 deutlich hervorgeht, zeigen die untersuchten Subpopulationen unspezifisch stimulierter T-Zellen ein ähnliches IFN- γ Sekretionsprofil wie Antigen-spezifisch stimulierte T-Zellen.

CD4 und CD8 T-Zellen zeigen sowohl bei einer Stimulation mit anti-CD3 als auch mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern eine Induktion von IFN- γ (Abb. 14 a+b). Dagegen findet man in anti-CD28 Antikörper-stimulierten T-Zellen vernachlässigbar wenige IFN- γ produzierende Zellen. IFN- γ sezernierende CD4 und CD8 T-Zellen sind viel stärker in der Gedächtnis Zellpopulation vertreten als in der naiven (Abb. 14 c+d).

Die beschriebenen Ergebnisse konnten ebenfalls bei polyklonaler Stimulation von T-Zellen in anti-CD3 bzw. anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper-beschichteten Zellkulturplatten reproduziert werden, wobei die Zellen nach einer 20-stündigen Stimulation neben der üblichen Untersuchung von IFN- γ , CD4, CD8 und CD45RA zusätzlich gegen CD62L gefärbt wurden. CD62L dient als Marker zur Unterscheidung von CD62L⁺ Zentralen (CM) und CD62L⁻ Effektor (EM) T-Gedächtniszellen.

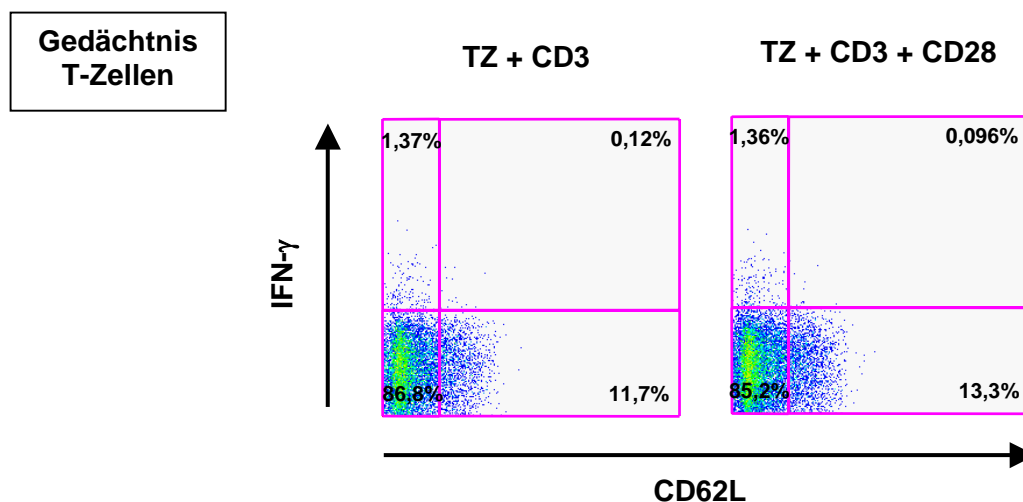


Abb. 15 IFN- γ -Sekretionsprofil von Antikörper-stimulierten Gedächtnis T-Zellen. Dargestellt sind die Prozentzahlen IFN- γ produzierender Gedächtnis T-Zellen gegen die Expression von CD62L in einem Punktediagramm. T-Zellen eines gesunden Spenders wurden in mit je 3 ml 1 μ g/ml anti-CD3 bzw. anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern beschichteten Zellkulturplatten für ca. 20 Stunden stimuliert, gegen IFN- γ , CD4, CD8, CD45RA und CD62L gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert. Tote, PI-positive Zellen wurden ausgegrenzt; CD4 und CD8 doppelpositive sowie CD45RA negative T-Zellen wurden eingegrenzt. Es ist eins von zwei Experimenten repräsentativ dargestellt.

Das IFN- γ Sekretionsprofil von polyklonal, in Antikörper-beschichteten Platten stimulierten T-Zellen unterschied sich nicht von dem in Abb. 14 und wurde deshalb nicht noch einmal dargestellt. Die IFN- γ Induktion in Zusammenhang mit einer CD62L Expression wurde durch Eingrenzung CD4⁺/CD8⁺ (T-Zellen) und CD45RA⁻ (Gedächtnis) Zellen untersucht (Abb. 15). Die Analyse ergab, dass die überwiegende Mehrheit der polyklonal stimulierten T-Zellen in der Effektor Gedächtnis (EM) T-Zell-Population angereichert waren.

Schlussfolgernd erbrachte die Analyse, dass sich nach einer Kurzzeit-Stimulation IFN- γ produzierende T-Zellen hauptsächlich in der Gedächtnis T-Zellpopulation befinden. Innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation sind es in erster Linie EM T-Zellen, die zur IFN- γ Produktion befähigt sind. Polyklonal stimulierte T-Zellen zeigten eine ähnliche IFN- γ Sekretion bei Stimulation des T-Zellrezeptors alleine (anti-CD3) sowie bei zusätzlicher Co-Stimulation (anti-CD3 + anti-CD28). Eine alleinige Co-Stimulation war dagegen nicht ausreichend. Innerhalb der T-Zellpopulation zeigten CD4 und CD8 Zellen keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Höhe ihrer IFN- γ Induktion.

Eine andere Methode zur Identifizierung und Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen ist der ELISpot-Test, der zwar nicht die gleichzeitige Analyse phänotypischer Marker erlaubt, jedoch den Vorteil einer höheren Spezifität und Sensitivität bezüglich der Detektion bietet (Czerkinsky 1988, Schmittel 1997). Das von Feuerer et al. 2001b beschriebene und in unserem Labor angewandte Protokoll, sieht eine 40-stündige Kurzzeit-Stimulation vor, unter der Annahme, ausschließlich sekundäre, Gedächtniszell-vermittelte Immunantworten zu induzieren.

Um diese Annahme zu verifizieren, sowie den Verlauf einer IFN- γ Antwort verschiedener T-Zellpopulationen über die Zeit zu bestimmen, wurde die IFN- γ Induktion in unseparierten, naiven bzw. Gedächtnis T-Zellen in einer 158-stündigen Kinetik verfolgt. Angereicherte, frisch isolierte T-Zellen aus dem Blut eines gesunden Spenders blieben unsepariert bzw. wurden entweder durch Depletion von CD45RO⁺ Zellen in naive bzw. durch Depletion von CD45RA⁺ Zellen in Gedächtnis T-Zellen aufgetrennt. Als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wurden CD3-depletierte autologe, mononukleäre Zellen mit Superantigen SEB bzw. irrelevantem Protein Endobulin übernacht beladen, mit den T-Zellen ko-inkubiert und die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen zu folgenden Zeiten nach Abstoppen der Stimulation bestimmt: 12, 19, 36, 46, 68, 158 Stunden.

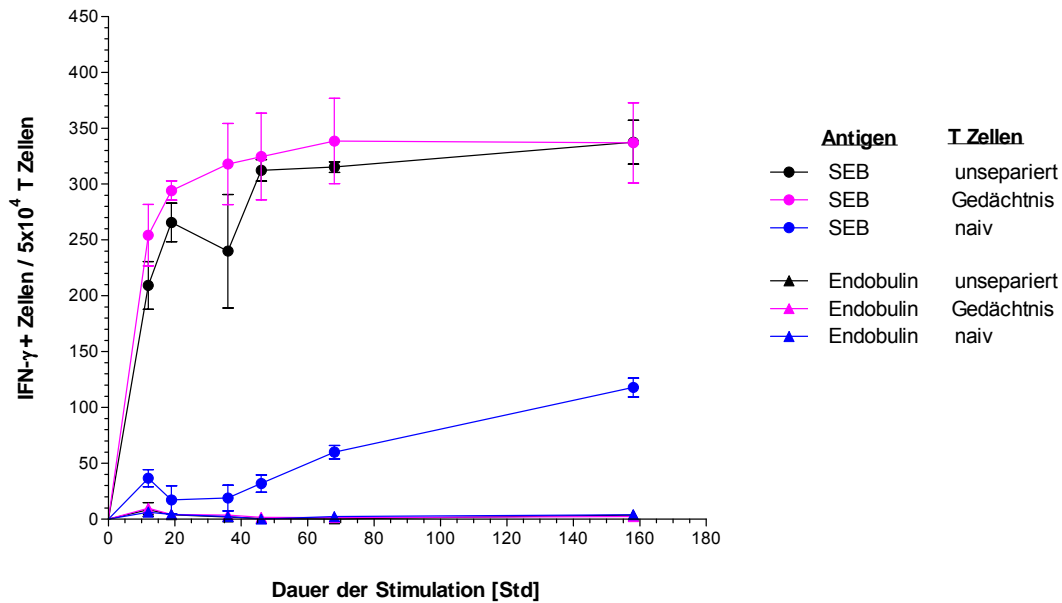


Abb. 16 IFN- γ Kinetik verschiedener Superantigen-stimulierter T-Zell-Populationen.

Dargestellt ist die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen pro 5×10^4 unseparierte, naive bzw. Gedächtnis T-Zellen gegen die Stimulationsdauer [Std.]. T-Zellen aus dem Blut eines gesunden Spenders blieben unsepariert oder wurden durch negative Selektion in naive bzw. Gedächtnis Zellen aufgetrennt und mit autologen CD3-depletierten mononukleären Zellen als Antigenpräsentierende Zellen stimuliert. Die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen wurde zu den indizierten Zeitpunkten bestimmt. Es ist eins von vier Experimenten repräsentativ dargestellt.

Wie aus Abb. 16 hervorgeht, werden innerhalb einer 40-stündigen Kurzzeit-Stimulation nahezu ausschließlich sekundäre, Gedächtniszell-vermittelte Immunantworten gemessen. Naive, primäre Immunantworten können dagegen vernachlässigt werden.

Die IFN- γ Induktion in Gedächtnis und unseparierten T-Zellen näherte sich mit anhaltender SEB-Stimulation asymptotisch einem Maximalwert an. Die Zahlen IFN- γ produzierender Zellen innerhalb der unseparierten Gruppe lagen dabei leicht niedriger verglichen mit denen separierter Gedächtnis T-Zellen. Dieser Effekt lässt sich mit einem geringeren Anteil an Gedächtniszellen in den unseparierten T-Zellen erklären. Die Anzahl IFN- γ sezernierender naiver T-Zellen war, wie bereits erwähnt, selbst mit SEB-Stimulation zu früheren Zeitpunkten vergleichsweise irrelevant, nahm jedoch zu späteren Zeitpunkten an Bedeutung zu.

Um die Reproduzierbarkeit der beobachteten Ergebnisse ebenfalls bei einer Stimulation der T-Zellen mit normalem Antigen zu bestätigen, wurden unseparierte, naive und

Gedächtnis T-Zellen mit dem „Recall“ Antigen Tetanus Toxoid bzw. irrelevantem Protein Endobulin, wie oben beschrieben, über einen insgesamt 35-stündigen Zeitraum stimuliert.

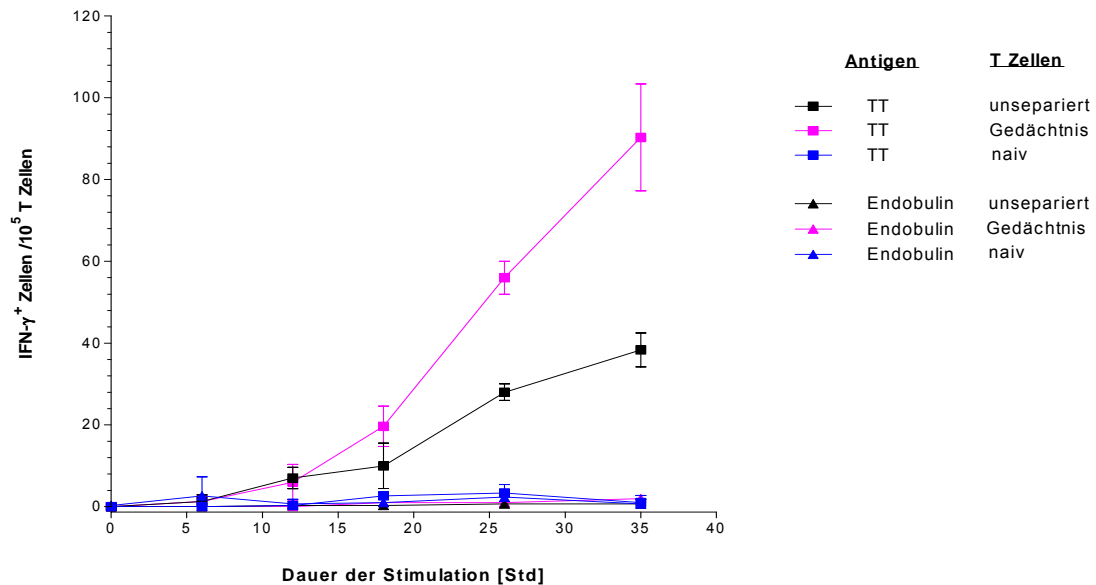


Abb. 17 IFN- γ Kinetik verschiedener Tetanus Toxoid-stimulierter T-Zell-Populationen.

Dargestellt ist die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen pro 1×10^5 unseparierte, naive bzw. Gedächtnis T-Zellen gegen die Stimulationsdauer [Std]. T-Zellen aus dem Blut eines gesunden Spenders blieben unsepariert oder wurden durch negative Selektion in naive bzw. Gedächtnis Zellen aufgetrennt und mit autologen CD3-depletierten mononukleären Zellen als Antigenpräsentierende Zellen stimuliert. Die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen wurde nach 6, 12, 18, 26 und 35 Std. bestimmt. Es ist eins von drei Experimenten repräsentativ dargestellt.

Aus Abb. 17 ist ersichtlich, dass sich die in Abb. 16 beobachteten Ergebnisse auch bei Stimulation mit spezifischem Antigen reproduzieren lassen. Während der 35-stündigen Kurzzeit-Stimulation kann die Zahl IFN- γ sezernierender Zellen innerhalb der naiven T-Zellen vernachlässigt werden. Ebenso konnte keine prägnante IFN- γ Produktion in allen Gruppen Endobulin-stimulierter T-Zellen detektiert werden. Unseparierte T-Zellen wiesen aufgrund ihres geringeren Anteils an Gedächtniszellen auch hier eine geringere IFN- γ Induktion auf als angereicherte Gedächtnis T-Zellen.

In den TT-stimulierten Gruppen wurden erwartungsgemäß wesentlich niedrigere Zahlen IFN- γ positiver Zellen gemessen als bei SEB-Stimulation, welches sich mit den viel niedrigeren Frequenzen TT-reaktiver T-Zellen erklären lässt.

Wie anhand des IFN- γ Sekretions-Tests belegt wurde, enthalten polyklonal stimulierte T-Zellen eine Anreicherung IFN- γ positiver Zellen innerhalb der Effektor Gedächtnis Zellpopulation. Dieser Sachverhalt wurde ebenfalls mit Hilfe des ELISpot-Tests untersucht.

Frisch isolierte mononukleäre Blutzellen eines gesunden Spenders wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD45RA, CCR7 und CD62L gefärbt und mit der Sortiervorrichtung des FACSvantage in Zentrale (CM) und Effektor (EM) T-Gedächtniszellen separiert. Die Zellen wurden auf vitale Lymphozyten, CD4⁺/CD8⁺ und CD45RA negative Gedächtniszellen eingegrenzt und anschließend in CCR7⁺/CD62L⁺ CM und CCR7⁻/CD62L⁻ EM T-Zellen sortiert.

Frisch sortierte CM und EM T-Zellen wurden in anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28 Antikörper-beschichteten bzw. -unbeschichteten IFN- γ ELISpot-Platten inkubiert und ihre IFN- γ Produktion zu folgenden Zeitpunkten gemessen: 4, 6, 10, 25, 49 Stunden.

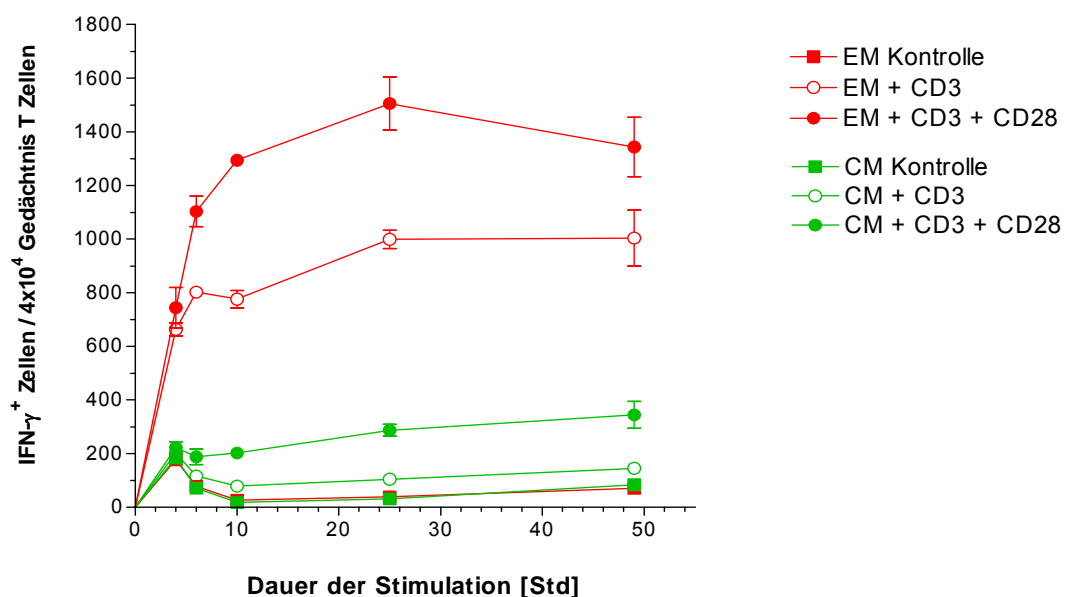


Abb. 18 INF- γ Kinetik Antikörper-stimulierter CM und EM T-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen pro 4×10^4 Zentraler (CM) bzw. Effektor (EM) Gedächtnis T-Zellen gegen die Stimulationsdauer [Std.]. CM und EM aus dem Blut eines gesunden Spenders wurden gegen CD4, CD8, CD45RA, CCR7 und CD62L gefärbt. Zellen wurden auf vitale Lymphozyten, CD4⁺/CD8⁺ und CD45RA⁻ Zellen eingegrenzt und in CCR7⁺/CD62L⁺ CM und CCR7⁻/CD62L⁻ EM T-Zellen sortiert. EM und CM T-Zellen wurden in mit anti-CD3 bzw. anti-CD3 + anti-CD28 Antikörper-beschichteten Platten stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Die Anzahl IFN- γ produzierender Zellen wurde zu den indizierten Zeitpunkten bestimmt. Es ist eins von fünf Experimenten repräsentativ dargestellt.

Abb. 18 lässt erkennen, dass die höchste IFN- γ Induktion bei Aktivierung des T-Zellrezeptors mit gleichzeitiger Co-Stimulation in EM T-Zellen erzielt wird. Eine ebenfalls hohe Anzahl IFN- γ produzierender T-Zellen findet man bei EM T-Zellen, die ausschließlich über anti-CD3 Antikörper aktiviert wurden. In beiden Fällen stieg innerhalb der ersten 10 Stunden die Anzahl IFN- γ sezernierender T-Zellen stark an, um sich anschließend einem Maximalwert anzunähern.

Die höchste Induktion von IFN- γ innerhalb der CCR7⁺ CM T-Zellpopulation erfordert die Aktivierung über anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper. Eine ausschließliche T-Zellrezeptor Aktivierung von CM T-Zellen induziert nur eine geringfügige IFN- γ Sekretion verglichen mit unstimulierten Zellen.

Mit Hilfe des ELISpot-Tests konnte verifiziert werden, dass in einer 40-stündigen Kurzzeit-Stimulation ausschließlich sekundäre, Gedächtniszell-vermittelte Immunantworten induziert werden. Die überwiegende Mehrheit IFN- γ produzierender Zellen blieb sogar bei einer bis zu 158-stündigen Stimulation in der Gedächtnis Zellpopulation vertreten, sowohl bei einer Stimulation mit dem Testantigen TT als auch bei einer Stimulation mit dem Superantigen SEB. Innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation wurde die stärkste IFN- γ Induktion in EM T-Zellen durch Aktivierung des T-Zellrezeptors mit gleichzeitiger Co-Stimulation beobachtet, eine niedrigere, jedoch ebenfalls prägnante IFN- γ Produktion auch bei alleiniger T-Zellrezeptor Aktivierung. Anti-CD3 und anti-CD28 stimulierte CM T-Zellen exhibierten ebenfalls IFN- γ sezernierende Zellen, wenngleich in geringerer Anzahl als EM T-Zellen. Die IFN- γ Induktion in ausschließlich T-Zellrezeptor stimulierten CM T-Zellen war vergleichsweise vernachlässigbar. Das IFN- γ Sekretionsprofil war in EM T-Zellen nur wenig von einer Costimulation abhängig; CM T-Zellen exhibierten hingegen eine stärkere Abhängigkeit von einem costimulatorischem Signal.

4.2.3 Apoptose von IFN- γ produzierenden EM und CM T-Zellen in Korrelation mit Expression von CCR7 nach Aktivierung

Eine Aktivierung von T-Zellen durch wiederholte Ligation des CD3-T-Zellrezeptor-Komplexes kann einen Aktivierungs-induzierten Zelltod (*activation-induced cell death*, AICD) initiieren. Die Stimulation aktivierter T-Zellen induziert eine erhöhte Expression des Fas-Liganden (FasL, CD95L), der nach Interaktion mit dem Fas-Rezeptor (CD95, Apo-1) eine Apoptose der T-Zelle auslöst. Antigen-induzierter AICD ist an der Terminierung zellulärer Immunantworten zur Wiederherstellung von Homöostase beteiligt und könnte darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Etablierung peripherer Immuntoleranz spielen. Um die Sterblichkeit aktivierter EM und CM T-Zellen nach Antikörper-vermittelter Stimulation in meinem Testsystem zu untersuchen, wurden PBMZ von gesunden Spendern in EM und CM T-Zellen sortiert und mit Antikörpern gegen CD3 bzw. CD3 und CD28 stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Eine Apoptose-Induktion über die Zeit wurde mit Hilfe von Annexin V- und Apo2.7-Färbung der Zellen durchflußzytometrisch bestimmt.

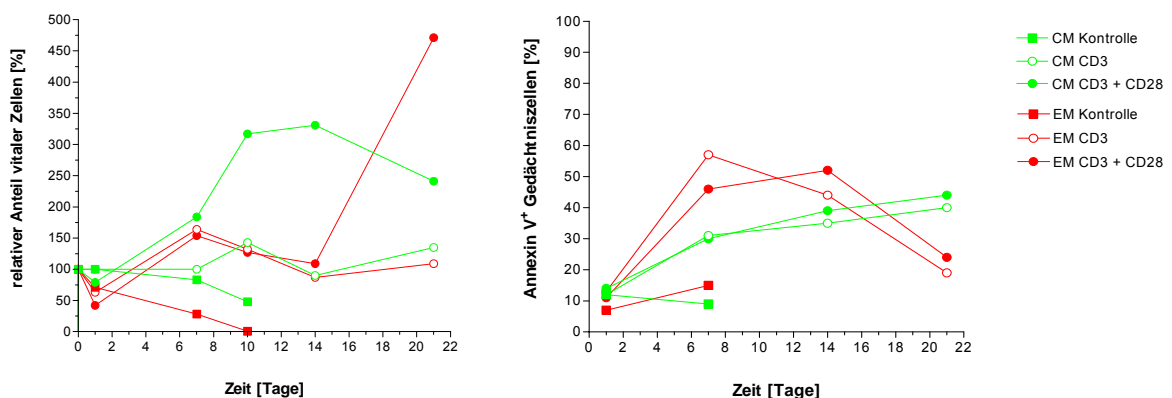


Abb. 19 Apoptose-Induktion und relativer Anteil vitaler Zellen innerhalb von EM und CM T-Zellen über die Zeit. Dargestellt sind die relativen Anteile vitaler Zellen [%] und zugehörig die Anzahl Annexin-V⁺ bzw. Apo2.7⁺ Zellen [%] von EM und CM T-Zellen über die Zeit [Tage] nach Stimulation mit CD3, CD3 und CD28 bzw. ohne Stimulation in einem Punktediagramm. Sortierte CM und EM T-Zellen aus frischisolierten PBMZ eines gesunden Spenders wurden in CD3-, CD3- und CD28-Antikörper-beschichteten bzw. unbeschichteten Platten übernachtet inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen gezählt und ein Teil zur durchflußzytometrischen Untersuchung von Annexin-V⁺ bzw. Apo2.7⁺ Zellen herangezogen. Es ist ein repräsentatives von insgesamt vier unabhängigen Experimenten dargestellt.

In Abbildung 19 sind die relativen Anteile vitaler und die Anzahl apoptotischer Annexin V⁺ CM und EM T-Zellen in einem repräsentativem Experiment als Kinetik dargestellt. Wie aus Abbildung E/CM1 hervorgeht, nimmt die relative Anzahl vitaler CM sowie EM T-Zellen bei fehlender Stimulation innerhalb weniger Tage ab. CM und EM T-Zellen, die mit CD3 und CD28 Antikörpern stimuliert wurden, exhibieren beide einen Anstieg in den relativen vitalen Zellzahlen wenngleich mit unterschiedlichen Kinetiken. CM T-Zellen zeigen eine schnellere Zunahme der relativen Zellzahlen zu frühen Zeitpunkten, EM T-Zellen dagegen einen verspäteten Anstieg ab Tag 14. Vergleicht man dies mit der Apoptose-Induktion in CD3- und CD28-stimulierten CM und EM T-Zellen, so nimmt die Anzahl apoptotischer Zellen in beiden Gruppen über die Zeit stark zu. Die beobachtete generelle Zunahme der relativen Zellzahlen in CD3- und CD28-stimulierten CM und EM T-Zellen - trotz einer ansteigenden Apoptose - lässt auf eine erhöhte Proliferation beider Zell-Populationen schließen. Die alleinige Stimulation mit CD3-Antikörpern erzielt in EM T-Zellen ebenfalls eine frühe Zunahme der relativen vitalen Zellzahlen, es fehlt allerdings der starke Anstieg zu späteren Zeitpunkten, obwohl die Apoptose-Induktion in beiden Stimulationsgruppen über die Zeit ähnlich verläuft. Dagegen führt die CD3 Stimulation bei CM T-Zellen nur zu einer geringen Vermehrung der Zellzahlen. Man kann daher davon ausgehen, dass in CD3- und CD28-stimulierten CM und EM T-Zellen eine größere Proliferation induziert wird als bei alleiniger CD3-Stimulation. Interessanterweise nahm die Apoptoserate bei EM T-Zellen zu späten Zeitpunkten stark ab – dies könnte die starke Expansion der Zellen nach CD3 und CD28 Stimulation erklären.

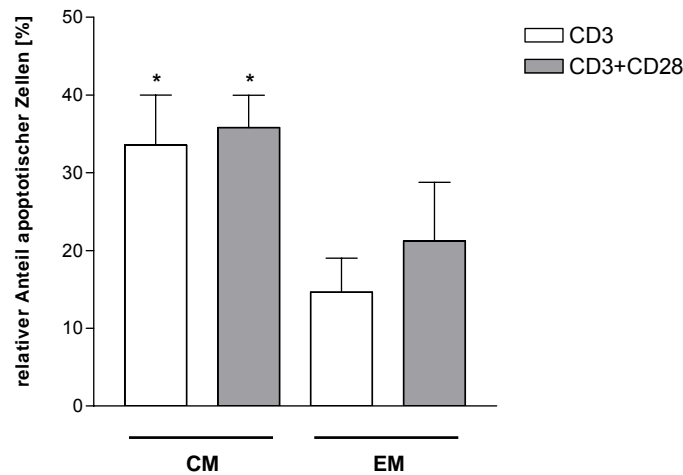


Abb. 20 Vergleich der Apoptose-Induktion in aktivierten CM und EM T-Zellen. Dargestellt ist die Anzahl apoptotischer Zellen [%] von CD3- bzw. CD3- und CD28-stimulierten EM und CM T-Zellen nach ca. 3 Wochen in einem Balkendiagramm. CM und EM T-Zellen wurden aus frischisolierten PBMZ eines gesunden Spenders sortiert und über Nacht in Antikörperbeschichteten Platten stimuliert. Apoptotische Annexin V⁺ bzw. Apo2.7⁺ Zellen wurden durchflußzytometrisch bestimmt. Es sind kumulative Werte aus insgesamt vier unabhängigen Experimenten angezeigt. P-Werte $\leq 0,1$ wurden als auffällig erhöht (*) angesehen.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, weisen CM T-Zellen zu einem späten Zeitpunkt nach Aktivierung (ca. drei Wochen) eine höhere Apoptose-Induktion auf als EM T-Zellen. Die Anzahl apoptotischer Zellen in aktivierten CM T-Zellen lagen sowohl bei CD3- sowie CD3- und CD28-Stimulation auffällig höher als bei aktivierten EM T-Zellen.

Der Nachweis einer erhöhten Apoptose-Induktion in stimulierten CM und EM T-Zellen verglichen mit der unstimulierten Kontrolle, führte nachfolgend zur Frage nach der Verteilung apoptotischer Apo2.7⁺ Zellen innerhalb IFN- γ produzierender CM und EM T-Zellen. Zugleich wurde eine Korrelation mit der differentiellen Expression des Subpopulation-spezifischen Markers CCR7 untersucht.

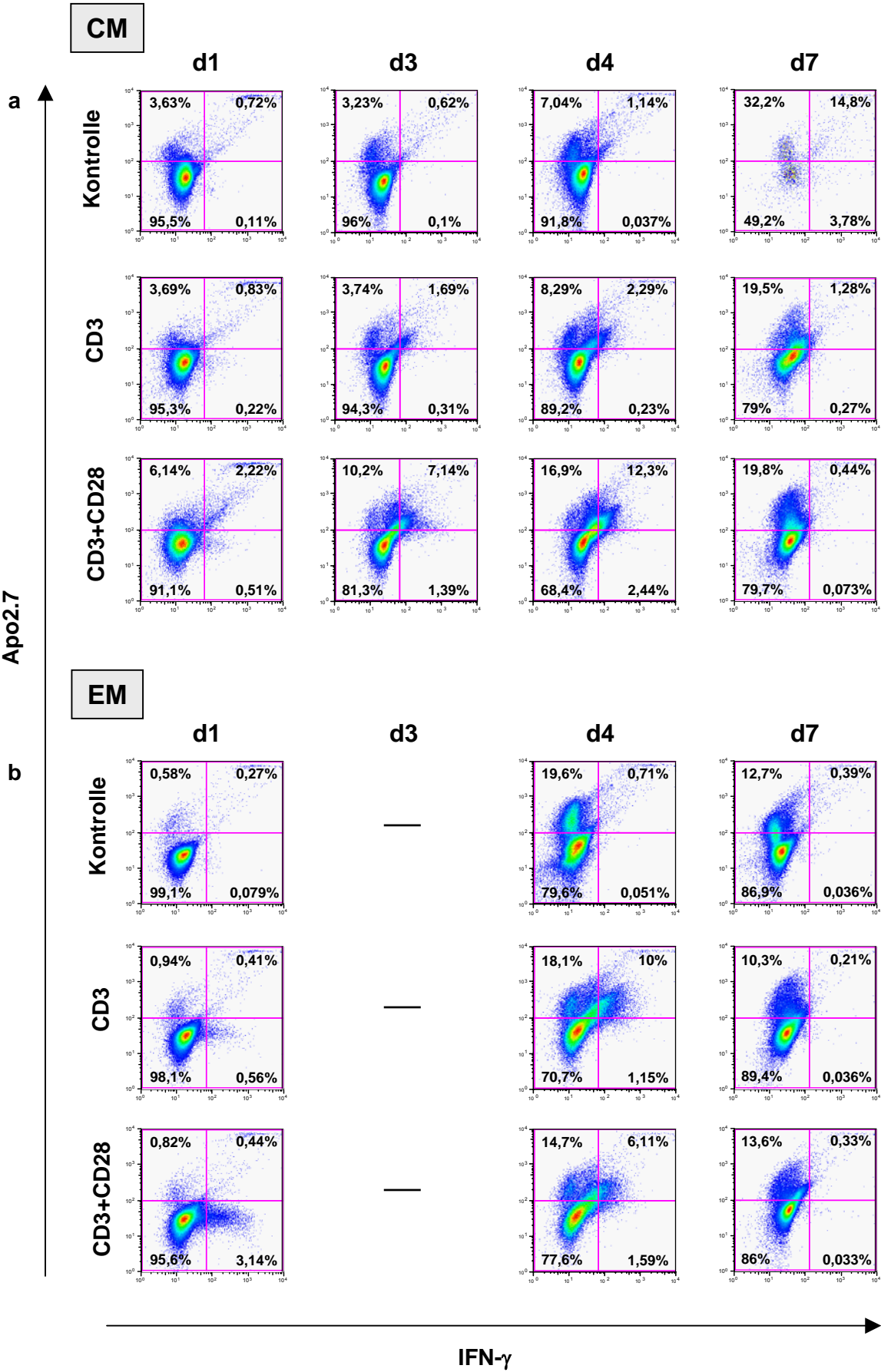


Abb. 21 Verteilung apoptotischer Zellen innerhalb $\text{IFN-}\gamma^+$ CM und EM T-Zellen nach Stimulation. Dargestellt ist die Anzahl apoptotischer Apo2.7⁺ gegen $\text{IFN-}\gamma^+$ Zellen [%] von CD3-, CD3- und CD28-stimulierten bzw. unstimulierten CM (a) und EM (b) T-Zellen zu definierten Zeitpunkten in einem Punktediagramm. Sortierte CM und EM T-Zellen aus frisch isolierten PBMZ eines gesunden Spenders wurden auf Antikörper-beschichteten bzw. unbeschichteten Platten übernacht inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten gegen intrazelluläres $\text{IFN-}\gamma$ und mit Apo2.7 gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Es ist ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Wie in Abbildung 21 ersichtlich ist, können am Tag 1 nach der Übernacht-Stimulation in beiden stimulierten CM T-Zell-Gruppen $\text{IFN-}\gamma$ produzierende Zellen detektiert werden, wobei der totale Anteil in den CD3- und CD28-aktivierten CM T-Zellen höher liegt als bei alleiniger CD3-Stimulation. In der unstimulierten Kontrolle findet man dagegen nur wenige $\text{IFN-}\gamma^+$ Zellen. Auffällig ist, dass die an Tag 1 nicht-apoptotischen $\text{IFN-}\gamma^+/\text{Apo2.7}^-$ Zellen über die Zeit verstärkt in die apoptotische Apo2.7⁺ Fraktion übergehen. Generell kann in allen Gruppen über die Zeit eine stete Zunahme $\text{IFN-}\gamma^+/\text{Apo2.7}^+$ doppeltpositiver Zellen beobachtet werden, die an Tag 4 einen Höchstwert erreichen. An Tag 5 sind die meisten $\text{IFN-}\gamma^+$ Zellen in beiden Stimulationsgruppen verschwunden (nicht gezeigte Daten), was durch die erhöhte Apoptose-Induktion an Tag 4 erklärt werden kann. Betrachtet man den prozentualen Anteil apoptotischer Zellen an der gesamten $\text{IFN-}\gamma$ positiven Fraktion zu diesem Zeitpunkt, so ist in allen Gruppen die überwiegende Mehrheit $\text{IFN-}\gamma$ produzierender Zellen zugleich apoptotisch.

Die in Abbildung 21 b dargestellten unterschiedlichen Stimulationsgruppen von EM T-Zellen weisen ähnliche Merkmale wie aktivierte CM T-Zellen auf, wobei an Tag 1 eine höhere $\text{IFN-}\gamma$ Induktion in CD3- und CD28-stimulierten EM T-Zellen verglichen mit CM T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Auch ist hier die Mehrheit der $\text{IFN-}\gamma^+$ EM T-Zellen an Tag 1 in der nicht-apoptotischen Apo2.7⁺ Population angereichert. An Tag 4 zeigen allerdings stimulierte EM ebenfalls wie CM T-Zellen, dass die ursprünglich nicht-apoptotischen $\text{IFN-}\gamma^+/\text{Apo2.7}^-$ Zellen in die apoptotische Apo2.7⁺ Fraktion übergegangen sind. Der Vergleich der prozentualen Anteile apoptotischer Zellen an der gesamten $\text{IFN-}\gamma$ positiven Fraktion von EM T-Zellen ergibt, dass an Tag 1 die Mehrheit der $\text{IFN-}\gamma$ produzierenden Zellen vital und nicht-apoptotisch ist, sich die Verteilung aber an Tag 4 umgekehrt hat und die absolute Mehrheit der $\text{IFN-}\gamma^+$ Zellen nun $\text{IFN-}\gamma^+/\text{Apo2.7}^+$ doppeltpositiv ist.

Als Nächstes wurde die Expression von intrazellulärem $\text{IFN-}\gamma$ im Hinblick auf die Co-Expression des Subpopulation-spezifischen Markers CCR7 untersucht.

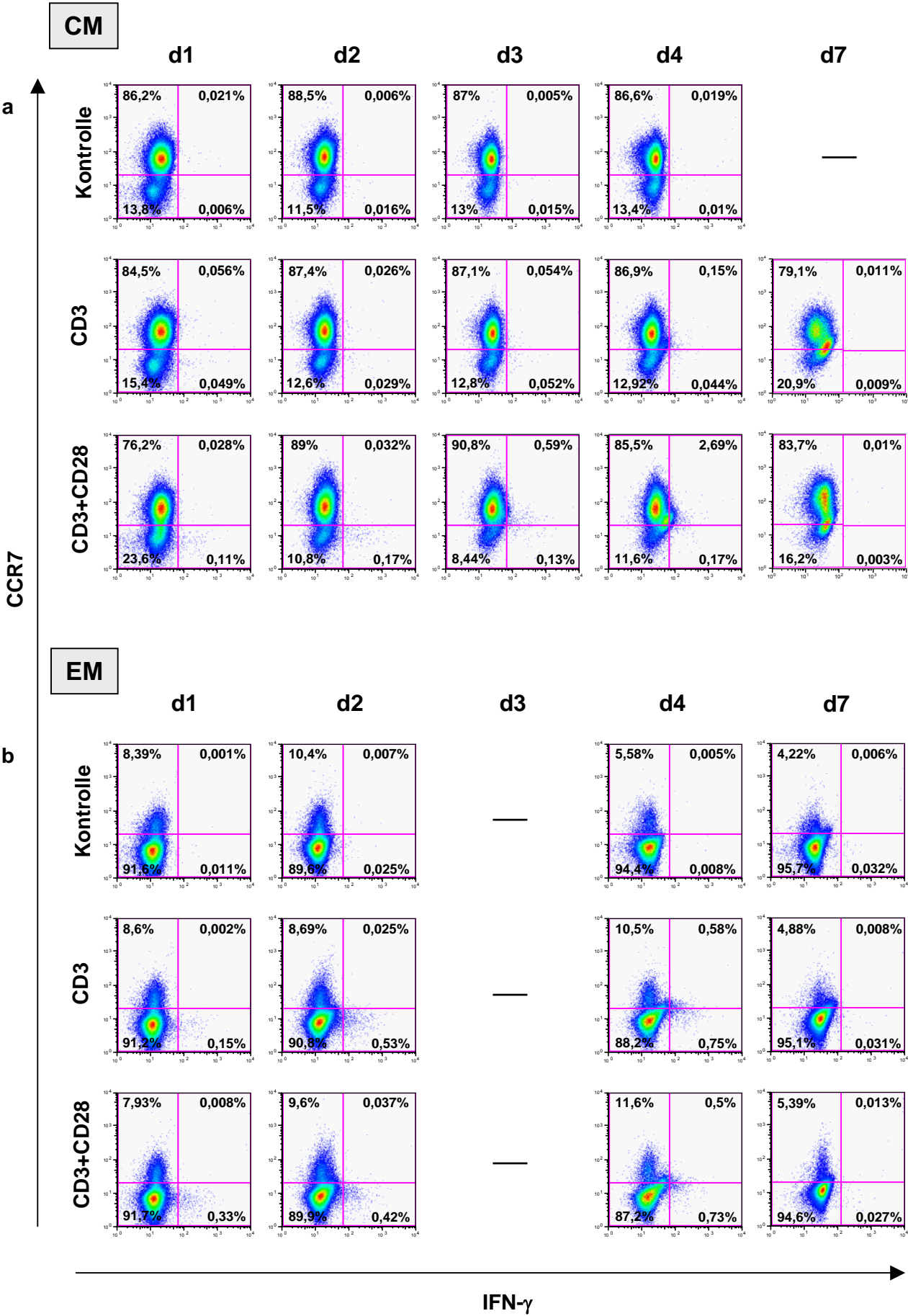


Abb. 22 Verteilung CCR7⁺ Zellen innerhalb IFN- γ ⁺ CM und EM T-Zellen nach Stimulation.

Dargestellt ist die Anzahl CCR7⁺ gegen IFN- γ ⁺ Zellen [%] von CD3-, CD3- und CD28-stimulierten bzw. unstimulierten CM (a) und EM (b) T-Zellen zu definierten Zeitpunkten in einem Punktediagramm. Sortierte CM und EM T-Zellen aus frisch isolierten PBMZ eines gesunden Spenders wurden auf Antikörper-beschichteten bzw. unbeschichteten Platten übernachtet inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten gegen CCR7, intrazelluläres IFN- γ und mit Apo2.7-Antikörpern gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Apoptotische Apo2.7⁺ Zellen wurden von der Analyse ausgegrenzt. Es sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dargestellt.

Die Analyse der CCR7 Expression stimulierter sowie unstimulierter CM (Abb. 22 a) und EM (Abb. 22 b) T-Zellen nach einer Übernacht-Inkubation zeigt, dass die vormals auf CCR7-Positivität sortierten CM T-Zellen in allen Gruppen CCR7 herunterregulieren sowie vormals auf CCR7-Negativität sortierte EM T-Zellen in allen Gruppen CCR7 hochregulieren.

Bei den CM T-Zellen weisen unstimulierte sowie CD3-stimulierte Zellen an Tag 1 ähnliche Mengen CCR7⁺ Zellen auf, die über die Zeit im allgemeinen konstant bleiben. Dagegen exhibieren CD3- und CD28-stimulierte CM T-Zellen an Tag 1 die höchste CCR7 Abnahme. Diese ist jedoch nur kurzzeitig; ab Tag 2 lässt sich kein wesentlicher Unterschied mehr in den Prozentzahlen CCR7⁺ Zellen zwischen den Gruppen erkennen. Bei den EM T-Zellen findet man an Tag 1 in allen Gruppen eine ähnliche CCR7 Zunahme. Die Anzahl CCR7⁺ Zellen bleibt in allen drei Stimulations-Gruppen bis Tag 4 hinweg relativ konstant, nimmt jedoch bis Tag 7 ab.

Die Untersuchung IFN- γ produzierender Zellen in Korrelation mit der Expression von CCR7 ergab, dass in stimulierten CM T-Zellen an Tag 1 und 2 innerhalb der CCR7⁺ Population mehr IFN- γ ⁺ Zellen vertreten sind als in der CCR7⁺ Population, mit 0,32% versus 0,07% an Tag 1 bzw. 0,23% versus 0,03% an Tag 2 für CD3-stimulierte und 0,46% versus 0,04% an Tag 1 bzw. 1,55% versus 0,04% an Tag 2 für CD3- und CD28-stimulierte CM T-Zellen. Analog fanden sich auch vermehrt IFN- γ ⁺ Zellen in der CCR7⁺ Fraktion in stimulierten EM T-Zellen, wobei hier jedoch der Anteil CCR7⁺ Zellen an der gesamten IFN- γ ⁺ Population höher lag (an Tag 1 bzw. 2 98,68% bzw. 95,5% für CD3-stimulierte und 97,63% bzw. 91,9% für CD3- und CD28-stimulierte EM T-Zellen). Ab Tag 3 bis 4 findet jedoch sowohl bei stimulierten CM sowie EM T-Zellen ein Übergang der vormals hauptsächlich IFN- γ ⁺/CCR7⁺ Zellen in die CCR7⁺ Population statt. An Tag 7 sind keine IFN- γ ⁺ Zellen mehr verblieben.

Aufgrund der Zunahme von IFN- γ ⁺ Zellen innerhalb der apoptotischen Apo2.7⁺ Population sowie innerhalb der CCR7⁺ Fraktion in stimulierten CM und EM T-Zellen ab Tag 3 bis 4,

sollte geklärt werden, ob die erhöhte CCR7 Expression in IFN- γ produzierenden Zellen mit einer Apoptose-Induktion in diesen Zellen einhergeht.

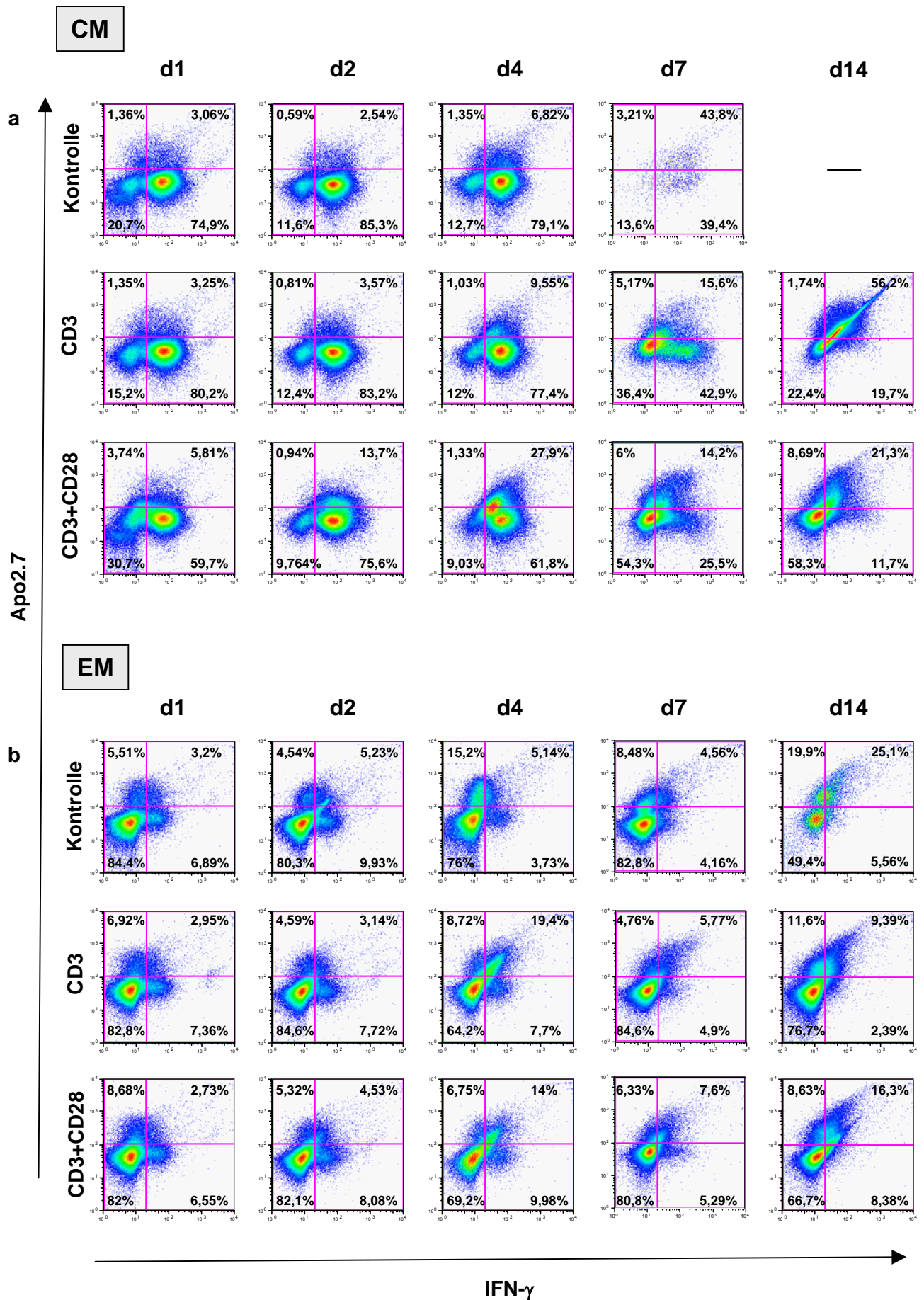


Abb. 23 Verteilung CCR7⁺ Zellen innerhalb apoptotischer CM und EM T-Zellen nach Stimulation. Dargestellt ist die Anzahl CCR7⁺ gegen apoptotische Apo2.7⁺ Zellen [%] von CD3-, CD3- und CD28-stimulierten bzw. unstimulierten CM (a) und EM (b) T-Zellen zu definierten Zeitpunkten in einem Punktediagramm. Sortierte CM und EM T-Zellen aus frisch isolierten PBMZ eines gesunden Spenders wurden auf Antikörper-beschichteten bzw. unbeschichteten Platten übernacht inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten gegen CCR7 und mit Apo2.7 gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Es sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dargestellt.

Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, ist in allen Stimulationsgruppen von CM T-Zellen zu allen Zeitpunkten die Mehrheit der apoptotischen Apo2.7⁺ Zellen zugleich CCR7⁺. Der Anteil CCR7⁺/Apo2.7⁺ doppeltpositiver Zellen nimmt dabei über die Zeit zu. Zwischen den einzelnen Gruppen ist kein wesentlicher Unterschied im Anteil CCR7⁺ Zellen an der gesamten apoptotischen Apo2.7⁺ Population erkennbar. An Tag 14 waren keine unstimulierten CM T-Zellen mehr vorhanden. In CD3 stimulierten CM T-Zellen waren mehr CCR7⁺/Apo2.7⁺ doppeltpositive Zellen zu finden (ca. 56%) als in CD3 + CD28 stimulierten Zellen (ca. 21%). Bei den EM T-Zellen (Abb. 28 b) ist an Tag 1 die Mehrheit der CCR7⁺ Zellen noch nicht apoptotisch. Ab Tag 2 nimmt jedoch die Anzahl CCR7⁺/Apo2.7⁺ doppeltpositiver Zellen über die Zeit stetig zu. Der Anteil apoptotischer Zellen innerhalb der gesamten CCR7⁺ Population, nimmt im Verlauf der Zeit zu, jedoch nicht so stark wie bei CM T-Zellen.

Die in Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse konnten ebenfalls in Experimenten reproduziert werden, in denen Annexin V als Marker für apoptotische Zellen verwendet wurde (siehe Abb. 24).

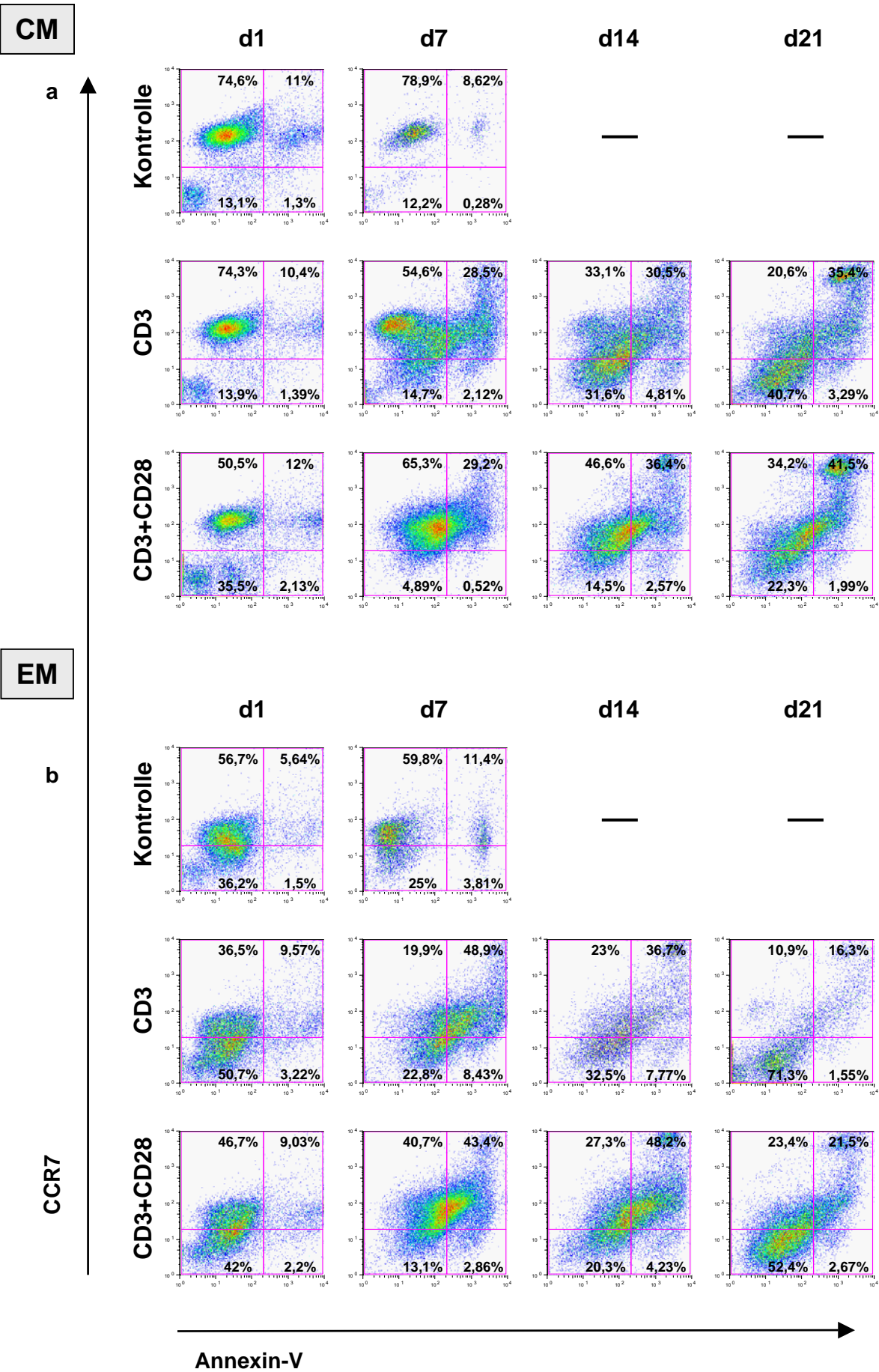


Abb. 24 Verteilung CCR7⁺ Zellen innerhalb apoptotischer CM und EM T-Zellen nach Stimulation. Dargestellt ist die Anzahl CCR7⁺ gegen apoptotische Annexin V⁺ Zellen von CD3-, CD3- und CD28-stimulierten bzw. unstimulierten CM (a) und EM (b) T-Zellen in Prozent zu definierten Zeitpunkten in einem Punktediagramm. Sortierte CM und EM T-Zellen aus frisch isolierten PBMZ eines gesunden Spenders wurden auf Antikörper-beschichteten bzw. unbeschichteten Platten übernacht inkubiert. Ein Teil der Zellen wurde zu den jeweiligen Zeitpunkten gegen CCR7 und Annexin V gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Es ist eins von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Auch hier zeigen vormals CCR7 positive CM und CCR7 negative EM T-Zellen an Tag 1 nach der Stimulation eine Herunter- bzw. Hochregulation von CCR7 (Abbildung 24). Die Hochregulation von CCR7 findet in EM T-Zellen nur temporär statt und nimmt zu späteren Zeitpunkten, in CD3-stimulierten stärker als in CD3- und CD28-stimulierten EM T-Zellen, wieder ab. Eine Korrelation der CCR7 Expression mit einer Apoptose-Induktion ergibt ebenfalls, dass die Mehrheit der apoptotischen Annexin V⁺ Zellen in der CCR7⁺ Population vertreten sind und dass die Anzahl CCR7⁺/Annexin V⁺ doppeltpositiver Zellen über die Zeit zunimmt. Allerdings finden sich hier mehr CCR7⁺ CM und EM T-Zellen, die nicht-apoptotisch bleiben.

Zusammenfassend zeigen CM T-Zellen nach einer Stimulation zu frühen Zeitpunkten eine Zunahme in der Proliferation, wohingegen EM T-Zellen einen verspäteten Proliferationsschub aufweisen. In CM T-Zellen ist eine zusätzliche Costimulation neben der TZR-Stimulation für eine Verstärkung und Verlängerung der Zellproliferation erforderlich, für EM T-Zellen gilt dies insbesondere für späte Zeitpunkte (ab Tag 14). Unterschiede in der Proliferation sind in CM T-Zellen stärker von der Art der Stimulation abhängig. CM und EM T-Zellen zeigen ähnliche Merkmale in phänotypischen und funktionalen Veränderungen nach einer Aktivierung. Die Apoptose-Induktion fällt in aktivierten CM T-Zellen stärker aus als in aktivierten EM T-Zellen. IFN- γ produzierende CM und EM T-Zellen sind zu frühen Zeitpunkten bevorzugt in der CCR7⁻ Fraktion zu finden, reichern sich aber nachfolgend in der CCR7⁺ Population an. Die CCR7-Induktion in IFN- γ produzierenden CM und EM T-Zellen korreliert dabei mit einer Apoptose der betroffenen Zellen.

4.2.4 Analyse des Zytokinprofils von reaktivierten Tumor-spezifischen Knochenmark und Blut Gedächtnis T-Zellen beim Mammakarzinom

Die bei Feuerer et al. (2001b) beobachtete funktionale Divergenz in der Anti-Tumor Reaktivität zwischen Tumor-spezifischen Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark und denen aus peripherem Blut beim Mammakarzinom beruhte auf der Untersuchung von TAA-spezifischer IFN- γ Sekretion durch TH1- und zytotoxische T-Zellen. Eine Tumor-spezifische TH2 Gedächtniszell-vermittelte Immunantwort wurde nicht untersucht.

Es sollte daher geklärt werden, ob Gedächtnis T-Zellen, die sich nicht zu IFN- γ produzierenden TH1 Effektorzellen reaktivieren lassen, stattdessen eine Tumor-spezifische TH2 Immunantwort bzw. eine IL-10 vermittelte Tumor-spezifische Toleranz induzieren.

Zur Untersuchung des TH1- und TH2-Zytokinprofils reaktiver Gedächtnis T-Zellen wurden angereicherte Blut und Knochenmark T-Zellen aus Patienten mit primärem Mammakarzinom mit TAA-beladenen autologen Dendritischen Zellen stimuliert und in einem 40-stündigem Kurzzeit ELISpot-Test gleichzeitig die Sekretion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 analysiert. Als TAA wurden Lysate von autologem Tumorgewebe aus dem Primärtumor oder Lymphknotenmetastasen eingesetzt, die mit Lysaten aus autologen PBMZ bzw. uninvolviertem Brustdrüsengewebe als Negativkontrolle verglichen wurden. Falls kein autologes Tumorgewebe gewonnen werden konnte, wurden Lysate aus MCF7-Zellen als TAA und aus U937-Zellen als Negativkontrolle zum Beladen der autologen Dendritischen Zellen verwendet. Alle Ansätze wurden in Triplikaten, in Einzelfällen in Quadruplikaten bzw. Duplikaten gemessen.

Die Reaktivität TAA-spezifischer T-Zellen wurde für Blut und Knochenmark in insgesamt 21 Mammakarzinom-Patienten untersucht. Die Patienten wurden als immunologisch reaktiv eingestuft, wenn die Anzahl der Zytokin-sezernierenden Zellen höher ($p < 0,1$) lag, als die der Negativkontrolle.

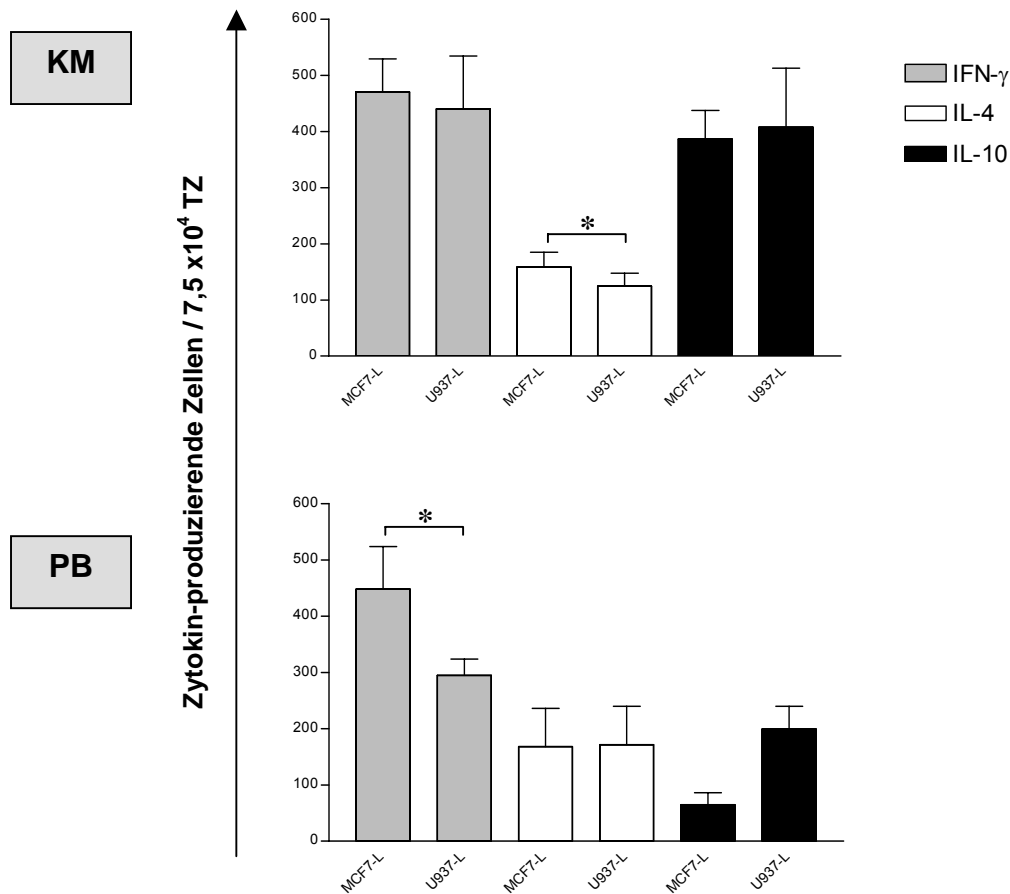


Abb. 25 TH1 und TH2 Zytokinprofil reaktiver Blut und Knochenmark Gedächtnis T-Zellen beim Mammakarzinom. Es ist das IFN- γ , IL-4 und IL-10 Sekretionsprofil stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) einer Mammakarzinom-Patientin in einem Balkendiagramm exemplarisch dargestellt. Angezeigt ist die Anzahl reaktiver T-Zellen (Mittelwert aus Triplikaten mit Standardabweichung) für eine Gesamtzahl von $7,5 \times 10^4$ T-Zellen pro Loch. Angereicherte T-Zellen wurden mit autologen Dendritischen Zellen in einem 40-stündigen ELISpot-Test stimuliert, die zuvor übernachtet mit MCF7-Lysat als TAA bzw. mit U937-Lysat als Negativkontrolle beladen worden waren. *, die Anzahl reaktiver T-Zellen ist signifikant höher ($p < 0,05$) als in der Negativkontrolle.

In Abb. 25 ist das TH1 und TH2 Zytokinprofil TAA-reaktiver Blut und Knochenmark T-Zellen eines Mammakarzinom-Patienten exemplarisch dargestellt. Wie aus der Abbildung hervorgeht, weisen bei diesem Patienten die Blut und Knochenmark T-Zellen eine unterschiedliche Polarisierung ihrer TH Gedächtniszell-Antwort auf: TAA-stimulierte Gedächtnis T-Zellen aus dem Blut produzierten IFN- γ , während jene aus dem Knochenmark IL-4 sekretierten.

Das TH1 und TH2 Sekretionsprofil sowie die gemittelten Frequenzen TAA-reaktiver Blut und Knochenmark Gedächtnis T-Zellen aller untersuchten Mammakarzinom-Patienten ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

Nr.	Patienten Nr.	TZ-Herkunft		Frequenzen Zytokin-sekretierender TZ		
				IFN- γ	IL-4	IL-10
1	562	KM		-	-	-
		PB		-	-	1 : 904
2	563	KM		-	1 : 2 206	-
		PB		1 : 490	-	-
3	564	KM		-	-	-
		PB		1 : 1 071	-	-
4	580	KM		1 : 820	1 : 2 083	-
		PB		-	-	-
5	648	KM		-	-	-
		PB		1 : 2 115	-	1 : 7 857
6	653	KM		-	-	-
		PB		-	1 : 20 000	-
7	659	KM		-	-	-
		PB		1 : 455	-	1 : 541
8	666	KM		-	1 : 4 000	-
		PB		-	-	-
9	754	KM		1 : 2 885	-	-
		PB		-	-	1 : 8 333
10	794	KM		-	-	-
		PB		-	-	-
11	808	KM		1 : 3 001	-	1 : 4 545
		PB		-	-	-
12	821	KM		-	-	1 : 642
		PB		-	-	-
13	851	KM		-	-	-
		PB		-	1 : 7 143	1 : 1 744
14	855	KM		-	-	-
		PB		-	-	-
15	887	KM	*mLK-L	-	1 : 9 091	-
		PB	*MCF7-L	1 : 5 882	1 : 5 556	1 : 1 087
16	900	KM		-	-	-
		PB		-	-	1 : 16 625
17	902	KM		-	-	-
		PB		-	-	-
18	904	KM		-	1 : 15 000	1 : 2 857
		PB		-	-	1 : 6 667
19	909	KM		-	-	-
		PB		-	-	-
20	914	KM		1 : 901	-	-
		PB		1 : 909	-	-
21	920	KM		-	-	-
		PB		-	-	-

Tab. 5 TH1 und TH2 Zytokinprofil reaktiver Blut und Knochenmark Gedächtnis T-Zellen beim Mammakarzinom. Es sind das IFN- γ , IL-4 und IL-10 Sekretionsprofil sowie die gemittelten Frequenzen stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) von 21 Mammakarzinom-Patienten dargestellt. Angereicherte T-Zellen (TZ) wurden mit autologen TAA- bzw. irrelevantem Antigen beladenen Dendritischen Zellen in einem 40-stündigen ELISpot-Test stimuliert und die Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 gemessen. *, PB und KM T-Zellen reagieren auf unterschiedliche TAAs; X, wurde nicht untersucht.

In TAA-reaktivierten Knochenmark T-Zellen kommen TH1 und TH2 Immunantworten in einer ähnlichen Häufigkeit vor (siehe Tabelle 5). Von insgesamt neun Patienten mit TAA-reaktiven T-Zellen im Knochenmark zeigten 5 eine IL-4, 4 eine IFN- γ und 3 eine IL-10 Induktion. Die Frequenzen der Zytokin-sezernierenden Knochenmark T-Zellen lagen für IL-4 bei 1:2083 – 1:15000, für IFN- γ bei 1:820 – 1:3001 und für IL-10 bei 1:642 – 1:4545.

Im Gegensatz dazu trat in Tumor-spezifischen Blut T-Zellen eine induzierte IL-4 Antwort seltener auf. Unter allen Patienten mit TAA-reaktiven T-Zellen im Blut produzierten 8/12 bzw. 7/12 IL-10 bzw. IFN- γ , jedoch nur 2/12 zeigten eine IL-4 Antwort. Hier lagen die Frequenzen reaktiver T-Zellen für IL-10 bei 1:541 – 1:16625, für IFN- γ bei 1:490 – 1:5882 und für IL-4 bei 1:5556 – 1:20000.

Auffällig ist, dass im Blut und im Knochenmark sowohl ausschließlich TH1- bzw. TH2-polarisierte sowie gemischt-polarisierte Immunantworten induziert werden können.

Abbildung 26 gibt die Anzahl an reaktiven versus nicht-reaktiven Testpersonen innerhalb der untersuchten Mammakarzinom-Patienten wieder.

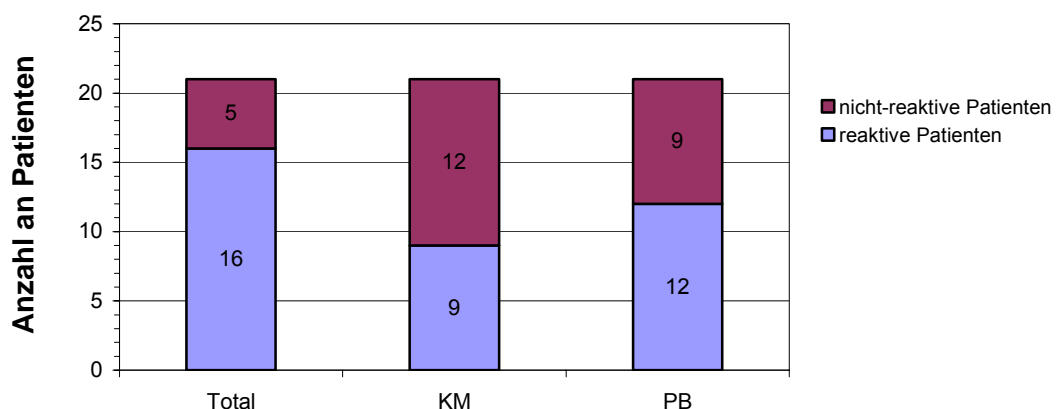


Abb. 26 Anzahl an reaktiven und nicht-reaktiven Patienten nach T-Gedächtniszell-Reaktivierung. Es ist die totale Anzahl an reaktiven und nicht-reaktiven Mammakarzinom-Patienten sowie die Verteilung innerhalb stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) dargestellt.

Von 21 untersuchten Mammakarzinom-Patienten ließen sich insgesamt 16 zu einer Tumor-spezifischen Immunantwort reaktivieren (Abb. 26). Neun von 21 Patienten zeigten eine Anti-Tumor Reaktivität im Knochenmark; im Blut konnte in 12 Patienten eine TAA-spezifische Zytokinproduktion induziert werden.

In Abbildung 27 ist zusammengefasst, aus welchen prozentualen Anteilen an induziertem IFN- γ , IL-4 und IL-10 sich das Sekretionsprofil stimulierter Blut und Knochenmark Gedächtnis T-Zellen ausschließlich reaktiver Patienten zusammensetzt.

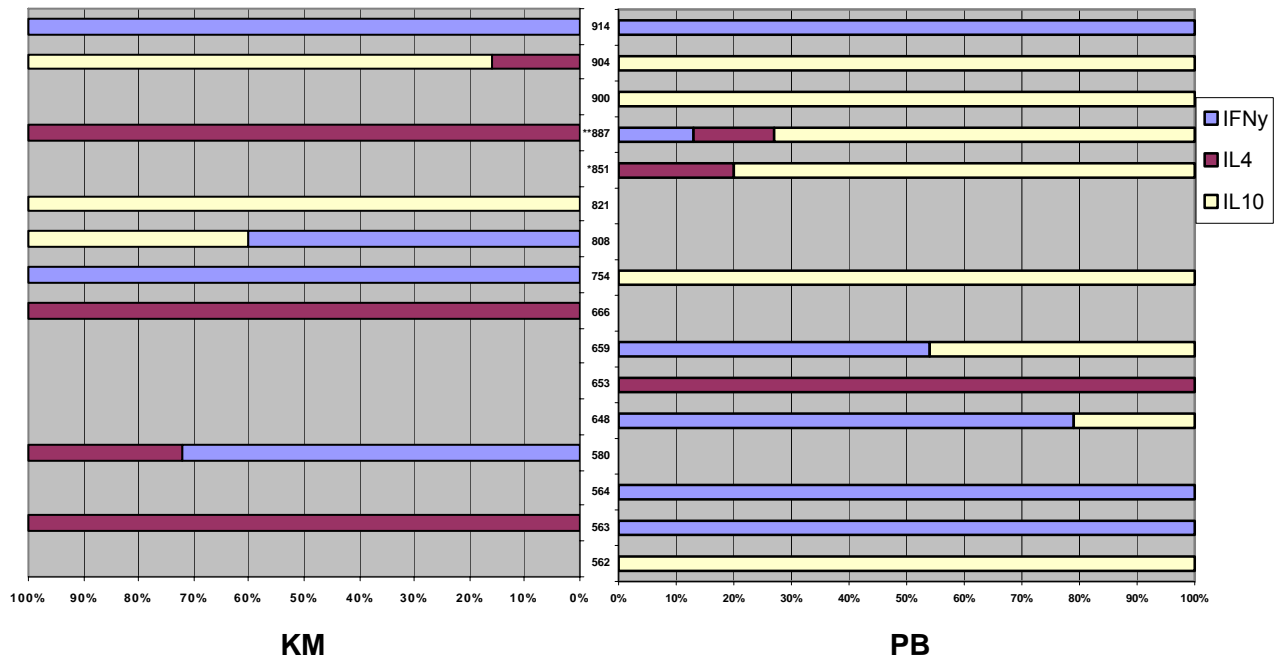


Abb. 27 Prozentuale Anteile an TH1 und TH2 Zytokinen am Sekretionsprofil reaktiver Gedächtnis T-Zellen. Es ist die Zusammensetzung des Sekretionsprofils stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) von ausschließlich reaktiven Mammakarzinom-Patienten aus Anteilen an induziertem IFN- γ , IL-4 und IL-10 [%] dargestellt. Die Zahlen auf der y-Achse zeigen die Patienten-Nr. an. *, Patient #851 war nur reaktiv gegen MCF7-Lysat, jedoch nicht gegen Tumor-Lysat aus einer Lymphknotenmetastase (mLK); **, KM und PB T-Zellen von Patient #887 zeigen eine Reaktion gegen unterschiedliche TAAs: KM gegen mLK, PB gegen MCF7-Lysat.

Die Patienten mit TAA-reaktiven T-Zellen im Knochenmark wiesen sowohl ausschließlich polarisierte (100% IFN- γ , IL-4 oder IL-10) sowie gemischte Immunantworten auf. Eine ausschließlich polarisierte Immunantwort kam von insgesamt neun reaktiven Patienten wie folgt vor: 3x 100% IL-4, 2x 100% IFN- γ und 1x 100% IL-10. Bei den restlichen drei reaktiven Patienten traten gemischt-polarisierte TH-Antworten mit 2 unterschiedlichen Zytokinen auf; eine gemischt-polarisierte Immunantwort bestehend aus einer Kombination aller drei Zytokine wurde nicht induziert. Bei gemischt-polarisierten T-Zellantworten findet sich generell eine höhere Frequenz INF- γ produzierender T-Zellen im Vergleich mit IL-4 produzierenden T-Zellen.

Im Blut konnte bei den insgesamt 12 reaktiven Patienten ebenfalls das Vorkommen ausschließlich polarisierter sowie gemischt-polarisierter Immunantworten beobachtet werden, wobei erste hier wie folgt auftraten: 4x 100% IL-10, 3x 100% IFN- γ und 1x 100% IL-4. Bei den restlichen 4 reaktiven Patienten kamen gemischt-polarisierte Immunreaktionen vor, bei denen in allen Fällen IL-10 induziert wurde. Im Gegensatz zum

Knochenmark trat im Blut bei einem Patienten eine Immunantwort auf, bei der alle drei Zytokine sekretiert wurden. IL-4 war in Kombination wieder das am schwächsten induzierte Zytokin.

In einem Fall (Patient Nr. 887) reagierten Knochenmark und Blut T-Zellen gegen unterschiedliche TAAs: im Knochenmark wurde eine IL-4 Antwort gegen Tumor-Lysat aus einer Lymphknotenmetastase und im Blut eine TH1- und TH2-Antwort gegen MCF7-Lysat (siehe Tabelle 5) ausgelöst.

Als Nächstes sollte geklärt werden, ob das beobachtete Zytokinprofil Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen für Mammakarzinom-Patienten charakteristisch ist, oder ob es sich um ein allgemeines Sekretionsmuster reaktiver Gedächtnis T-Zellen handelt. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde analog die Induktion von TH-Antworten in gesunden Donoren untersucht, die mit Tetanus Toxoid (TT) als Testantigen restimuliert worden waren. Angereicherte Blut und Knochenmark T-Zellen von gesunden Spendern wurden mit TT- bzw. als Negativkontrolle mit Endobulin-präsentierenden autologen Dendritischen Zellen in einem 40-stündigem ELISpot-Test stimuliert und die Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 gemessen.

Tabelle 6 fasst das TH1 und TH2 Sekretionsprofil sowie die gemittelten Frequenzen TT-reaktiver Blut und Knochenmark T-Zellen aller untersuchter Donoren zusammen.

Nr.	Donoren Nr.	TZ-Herkunft	Frequenzen Zytokin-sekretierender TZ		
			IFN- γ	IL-4	IL-10
1	625	KM	-	-	-
		PB	-	-	-
2	627	KM	-	-	-
		PB	1 : 2 344	1 : 12 005	1 : 867
3	628	KM	1 : 16 667	-	-
		PB	1 : 1 622	-	1 : 13 038
4	637	KM	-	-	-
		PB	1 : 13 038	-	-
5	638	KM	-	-	1 : 2 941
		PB	1 : 10 718	-	-
6	644	KM	1 : 1 100	-	1 : 1 447
		PB	1 : 771	1 : 1 602	1 : 1 618
7	665	KM	X	X	X
		PB	1 : 1 010	-	1 : 6 124
8	684	KM	-	-	-
		PB	-	-	-
9	685	KM	-	-	-
		PB	-	-	-
10	708	KM	-	-	1 : 638
		PB	-	-	-
11	752	KM	-	-	-
		PB	-	-	-
12	763	KM	-	-	-
		PB	1 : 417	1 : 9 091	-
13	809	KM	1 : 485	-	1 : 1 293
		PB	1 : 463	1 : 13 038	1 : 4 286
14	810	KM	1 : 4 545	1 : 12 500	-
		PB	1 : 2 381	1 : 21 459	1 : 920
15	811	KM	1 : 1 141	-	-
		PB	1 : 383	-	-
16	812	KM	1 : 4 688	-	-
		PB	1 : 958	-	1 : 1 887
17	817	KM	-	-	1 : 1 467
		PB	1 : 759	-	-
18	818	KM	-	-	-
		PB	-	-	-
19	844	KM	-	-	-
		PB	-	-	-
20	847	KM	-	-	-
		PB	1 : 1 408	-	-
21	848	KM	1 : 476	-	-
		PB	1 : 410	1 : 5 263	-
22	925	KM	-	-	-
		PB	1 : 492	-	-
23	926	KM	1 : 2 258	-	-
		PB	1 : 3 043	-	-

Tab. 6 TH1 und TH2 Zytokinprofil reaktiver Blut und Knochenmark Gedächtnis T-Zellen von gesunden Spendern. Es sind das IFN- γ , IL-4 und IL-10 Sekretionsprofil sowie die gemittelten Frequenzen stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) von 23 bzw. 22 gesunden Donoren dargestellt. Angereicherte T-Zellen (TZ) wurden mit autologen TT- bzw. als Negativkontrolle mit Endobulin-präsentierenden Dendritischen Zellen in einem 40-stündigen

ELISpot-Test stimuliert und die Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 gemessen. X, wurde nicht untersucht.

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, werden nach Reaktivierung mit TT in gesunden Donoren hauptsächlich IFN- γ Immunantworten induziert.

Von insgesamt 11 Spendern, die TT-reaktive T-Zellen im Knochenmark aufwiesen, exhibierten insgesamt 8 eine IFN- γ , 5 eine IL-10 und nur 1 eine IL-4 Antwort. Die Frequenzen der Zytokin-sezernierenden Knochenmark T-Zellen lagen für IFN- γ bei 1:476 – 1:16667, für IL-10 bei 1:638 – 1:2941 und für IL-4 bei 1:12500.

Von den insgesamt 16 Donoren, deren Blut T-Zellen reaktiv gegen TT waren, induzierten alle 16 eine IFN- γ Antwort, darunter 7 bzw. 6 zusätzlich eine IL-10 bzw. IL-4 Antwort. Hier lagen die Frequenzen reaktiver T-Zellen für IFN- γ bei 1:383 – 1:13038, für IL-10 bei 1:867 – 1:13038 und für IL-4 bei 1:1602 – 1:21459.

Abbildung 28 gibt die Anzahl an reaktiven versus nicht-reaktiven Testpersonen innerhalb der untersuchten gesunden Spender wieder.

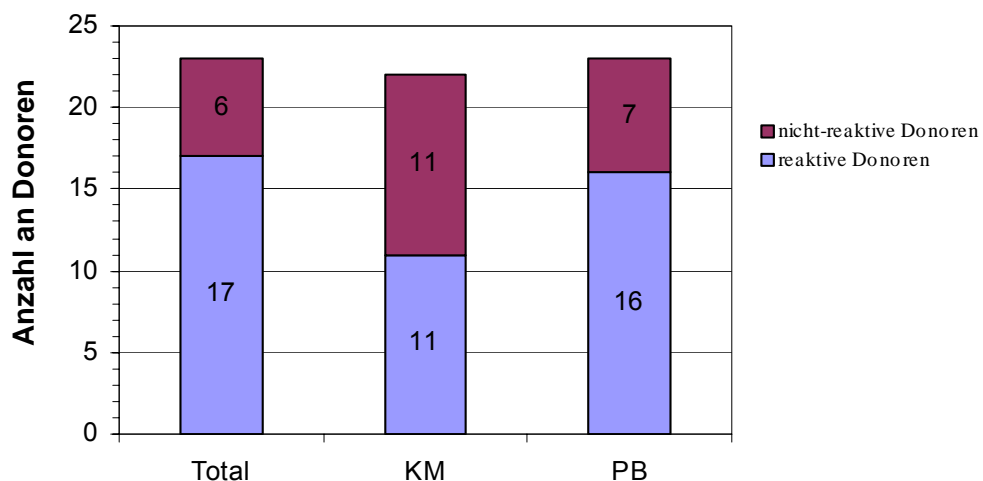


Abb. 28 Anzahl an reaktiven und nicht-reaktiven Donoren nach T-Gedächtniszell-Reaktivierung. Es ist die totale Anzahl an reaktiven und nicht-reaktiven gesunden Spendern sowie die Verteilung innerhalb stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) dargestellt.

Von 23 untersuchten gesunden Spendern ließen sich insgesamt 17 zu einer TT-spezifischen Immunantwort reaktivieren (Abb. 28). Elf von 22 Donoren zeigten eine Reaktivität ihrer Knochenmark T-Zellen; in 16 von 23 Spendern konnte eine Antigen-spezifische Zytokinproduktion in Blut T-Zellen induziert werden.

Abbildung 29 fasst zusammen, aus welchen prozentualen Anteilen an induziertem IFN- γ , IL-4 und IL-10 sich das Sekretionsprofil stimulierter Blut und Knochenmark Gedächtnis T-Zellen ausschließlich reaktiver Donoren zusammensetzt.

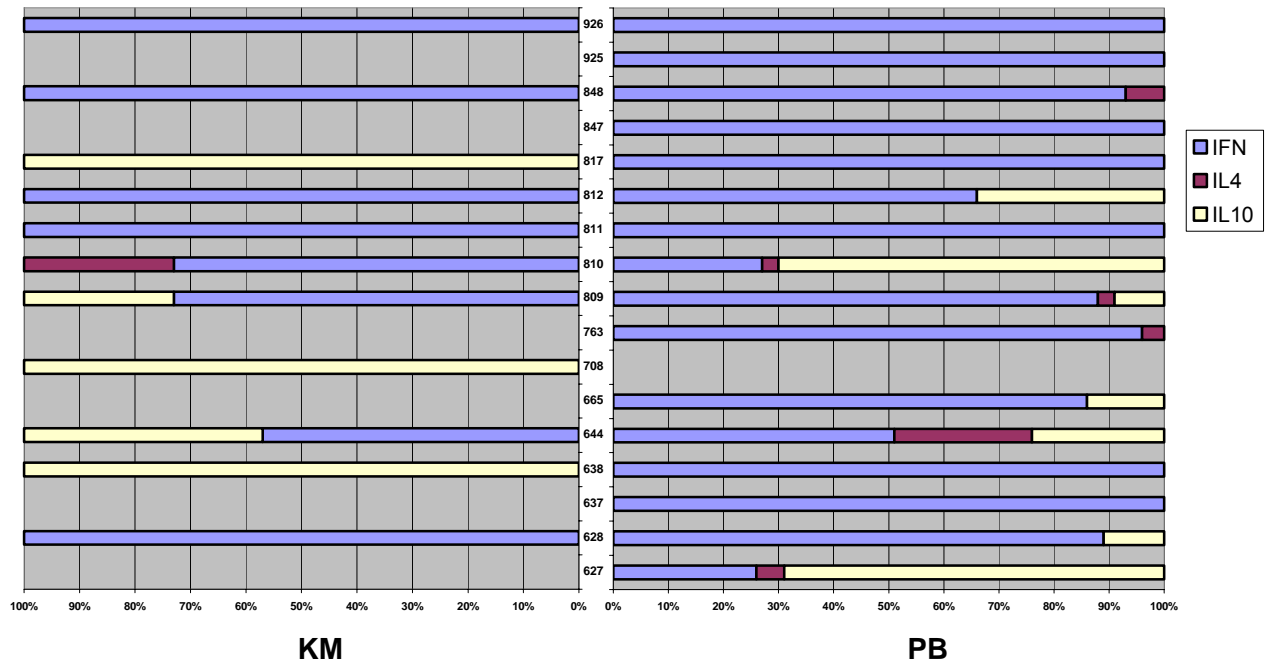


Abb. 29 Prozentuale Anteile an TH1 und TH2 Zytokinen am Sekretionsprofil reaktiver Gedächtnis T-Zellen. Es ist die Zusammensetzung des Sekretionsprofils stimulierter Blut- (PB) und Knochenmark-T-Zellen (KM) von ausschließlich reaktiven gesunden Spendern aus Anteilen an induziertem IFN- γ , IL-4 und IL-10 [%] dargestellt. Die Zahlen auf der y-Achse zeigen die Donoren-Nr. an.

Die Mehrheit der gesunden Donoren mit TT-reaktiven T-Zellen im Knochenmark produzierte vor allem IFN- γ Immunantworten, daneben kam es jedoch ebenfalls zu einer Induktion von TH2 Zytokinen. Eine ausschließlich polarisierte Immunantwort kam von insgesamt elf reaktiven Spendern wie folgt vor: 5x 100% IFN- γ und 3x 100% IL-10. Bei den restlichen drei reaktiven Donoren traten gemischt-polarisierte TH-Antworten mit 2 unterschiedlichen Zytokinen auf; eine gemischt-polarisierte Immunantwort bestehend aus einer Kombination aller drei Zytokine wurde nicht induziert. IL-4 wurde nur von 1 aus insgesamt elf reaktiven Donoren sekretiert. IFN- γ war in Kombination mit einem TH2 Zytokin das hauptsächlich induzierte Effektormolekül.

In Blut T-Zellen wurde in allen 16 reaktiven gesunden Spendern eine IFN- γ Antwort ausgelöst. Eine ausschließliche Polarisierung trat nur bei beim TH1 Zytokin auf: 7x 100% IFN- γ .

In den restlichen 9 reaktiven Donoren kamen gemischt-polarisierte Immunreaktionen vor, bei denen in 7 von 9 Fällen IL-10 induziert wurde. Im Gegensatz zum Knochenmark wurde im Blut von 4 gesunden Spendern eine Kombination aus allen drei Zytokinen induziert. In der Mehrheit der Fälle war IFN- γ das Zytokin, das in Kombination mit TH2 Zytokinen den größten prozentualen Anteil am Sekretionsprofil besaß. Dagegen war IL-4 auch hier wieder das in Kombination am schwächsten induzierte Zytokin.

Diese Ergebnisse stellen eine Diskrepanz zu den Daten von Feuerer et al. (2001b) dar, bei denen lediglich TAA-spezifische T-Zellen aus dem Knochenmark jedoch nicht die aus dem Blut zu IFN- γ produzierenden und zytotoxischen Effektorzellen reaktiviert werden konnten. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Verwendung von Dendritischen Zellen unterschiedlicher Herkunft sein. So wurden bei Feuerer et al. (2001b) DZ aus mononukleären Zellen aus dem Knochenmark generiert, während sie hier wegen Materialmangel aus PBMZ gewonnen wurden. Wie Bai et al. (2003) demonstrierten, können sich dabei aus Knochenmark generierte DZ funktional von solchen aus dem Blut unterscheiden.

Schlussfolgernd kam im Knochenmark von Mammakarzinom-Patienten viel häufiger und in einem stärkeren Ausmaß IL-4 als Tumor-spezifische Immunantwort vor verglichen mit einer IL-10 Induktion. Umgekehrte Verhältnisse konnten im Blut beobachtet werden, wo am häufigsten ausschließlich IL-10-polarisierte Antworten beobachtet wurden und wo in allen gemischt-polarisierten Immunreaktionen eine IL-10 Sekretion stattfand.

Der Vergleich des Zytokinprofils von Mammakarzinom-Patienten mit dem von gesunden Spendern ergab, dass letztere generell viel seltener und in einem geringeren Ausmaß IL-4 induzierten, dafür aber viel häufiger und in einem größeren Ausmaß IFN- γ produzierten. Des weiteren kamen IL-10 Antworten bei Donoren ebenfalls seltener und weniger stark ausgeprägt vor verglichen mit denen bei Mammakarzinom-Patienten.

Auffällig ist, dass eine Immunantwort bestehend aus einer Kombination aus allen drei Zytokinen sowohl bei Mammakarzinom-Patienten als auch bei Donoren nur im Blut vorkam. Übergreifend war in der Mehrheit aller Fälle IFN- γ das am stärksten und IL-4 das am schwächsten sezernierte Zytokin in Kombination mit anderen Zytokinen.

4.2.5 Analyse des Zytokinprofils von autologem Tumorlysat und Plasma von Mammakarzinom-Patienten

Die primäre Aktivierung naiver T-Zellen durch antigenpräsentierende Dendritische Zellen findet in sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. dem Lymphknoten, statt. Aktivierte Dendritische Zellen sind dabei in der Lage, über eine Reihe von Faktoren, wie die Art und Menge von Antigen, Costimulation und Zytokinsekretion, die Differenzierung von T-Zellen zu TH1-, TH2- oder regulatorischen T-Zellen und damit die Art der T-Zellantworten zu beeinflussen (Lanzavecchia and Sallusto 2000a). Die Fähigkeit von Dendritischen Zellen, bestimmte T-Zell-polarisierende Zytokine zu sezernieren, wird wiederum bei ihrer Aktivierung durch die Art des Reifungsstimulus, durch „feedback“-Signale von T-Zellen sowie durch Signale aus der Umgebung bestimmt (Kalinski et al. 1999). Insofern kann ein bestimmtes Zytokinmilieu am Ort und zum Zeitpunkt der Dendriten-Aktivierung eine wichtige Rolle bei der nachfolgenden Polarisierung von T-Zellantworten spielen.

Daher sollte untersucht werden, ob das lokale Zytokinmilieu im Tumor sowie das systemische Zytokinprofil im Plasma von Mammakarzinom-Patienten mit den induzierten TH1- und TH2 Antworten TAA-reaktiver Blut- und Knochenmark T-Zellen im ELISpot korreliert. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, TGF- β 1 und PGE₂ in Tumorlysaten und im Plasma mit Hilfe des ELISA-Tests quantitativ bestimmt.

Patienten Nr.	Zytokinprofil [pg/ml]						
	TGF- β 1	IL-12	PGE ₂	IL-4	IL-10	IFN- γ	IL-15
648	104,11	X	X	3,34	X	X	X
667	nd	X	140	0,13	nd	nd	X
754	130,72	1,04	33,8	0,01	nd	nd	1,63
801	95,41	X	X	0,64	nd	X	X
821	224,47	X	415	0,04	X	X	X
855	89,63	0,6	666,67	1,37	1,33	27	22,18
902	127,4	X	725	1,51	0,32	X	X
904	73,58	X	X	0,05	X	X	X
909	325,22	0,14	X	X	X	X	X
920	345,03	X	365	0,79	nd	nd	X

Tab. 7 Zytokinprofil von Tumorlysaten primärer Brustkrebs-Patientinnen. In der Tabelle sind die gemessenen Konzentrationen [pg/ml] an TGF- β 1, IL-12, PGE₂, IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-15 in

Tumorlysaten von Mammakarzinom-Patienten im ELISA Test zusammengefasst. X, nicht getestet; nd, nicht detektierbar.

Tabelle 7 fasst die gemessenen Konzentrationen an untersuchten Zytokinen in Tumorlysaten zusammen. Aufgrund der geringen Tumormenge, die von Mammakarzinom-Patienten erhalten wurden, konnten teilweise nur wenige Zytokine im ELISA-Test gemessen werden (siehe „X“, nicht getestet). Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, konnten sowohl immunsuppressive als auch immunstimulatorische Zytokine im Tumorgewebe von Mammakarzinom-Patienten nachgewiesen werden. Die Zytokinprofile zwischen den einzelnen Patienten lassen kein allgemeines Muster erkennen. Der Vergleich des Zytokinprofils der Tumorlysate von Patientin Nr. 754 mit Nr. 902 beispielsweise ergibt trotz ähnlicher TGF- β 1 Konzentrationen starke Unterschiede in den Mengen der übrigen getesteten Zytokine. So sind PGE₂-, IL-4- und IL-10-Werte in Tumorlysate Nr. 902 im Gegensatz zu Nr. 754 stark erhöht. Ähnliche Unterschiede können ebenfalls beim Vergleich von Tumorlysate Nr. 754 mit Nr. 855 beobachtet werden, wo trotz ähnlicher TGF- β 1 Konzentrationen stark divergierende Mengen an PGE₂, IL-4, IL-10 sowie IFN- γ und IL-15 auftreten.

Tumorkonzentrationen korrelierten dabei nicht mit Plasmakonzentrationen, was auf eine lokale TGF- β Produktion schließen lässt (s. Tab. 8). Es fand sich auch keine Korrelation der Tumor-Lysat Konzentrationen der übrigen Zytokine mit den Plasmawerten derselben Patienten (nicht gezeigte Daten).

Patienten Nr.	TGF- β 1 [pg/ml]		ELISpot
	Tumor-Lysat	Plasma	
648	104,11	X	IFN- γ , IL-10
667	0	X	- *
754	130,72	958,68	IFN- γ , IL-10
801	95,41	4806	-
808	X	2508,6	IFN- γ , IL-10
821	224,47	1833,6	IL-10
851	X	6544	IL-4, IL-10
855	89,63	4859	-
887	X	3482	IFN- γ , IL-4, IL-10
900	X	4380	IL-10
902	127,4	1693	-
904	73,58	X	IL-4**, IL-10
909	325,22	2727	-
914	X	4503	IFN- γ
920	345,03	X	-

Tab. 8 Korrelation des TGF- β 1 Gehalts in Tumorlysaten und Plasma mit der induzierten T-Zellantwort im ELISpot. Dargestellt ist eine Auflistung der gemessenen TGF- β 1 Konzentrationen [pg/ml] in Tumorlysaten und Plasma von Mammakarzinom-Patienten im ELISA Test sowie zugehörig die induzierten T-Zellantworten im ELISpot. Erhöhte TGF- β 1 Werte wurden in rot hervorgehoben (TGF- β 1 > 152 pg/ml für Tumorlysate; TGF- β 1 > 4000 pg/ml für Plasma). X, wurde nicht getestet; *, das Zytokin IL-4 wurde im ELISpot nicht untersucht; Die TAA-induzierte Zytokinantwort im ELISpot ist signifikant höher ($p < 0,05$) als die der Negativkontrolle, mit Ausnahme von **, eine TAA-induzierte IL-4 Antwort mit statistischer Signifikanz $p < 0,1$.

In Tabelle 8 sind die gemessenen Konzentrationen von immunsuppressivem TGF- β 1 in Tumorlysaten und im Plasma von Mammakarzinom-Patienten sowie die zugehörigen induzierten T-Zellantworten im ELISpot zusammengefasst. Erhöhte TGF- β 1 Werte wurden in rot gekennzeichnet und wie folgt definiert: für das Tumorlysat lagen keine Literaturangaben vor, so dass TGF- β 1 Werte, die oberhalb des gemittelten Durchschnitts (152 pg/ml) lagen, als relativ erhöht angesehen wurden; für das Plasma lagen Referenzen für TGF- β 1 Normalwerte bei 2590 ± 1400 pg/ml (Wakefield et al. 1995, Shirai et al. 1994, Tsushima et al., 1996, Kong et al. 1995 und 1996, Ivanovic et al. 2003, Power et al. 2002, Houi et al. 2002). In Tabelle 9 und in Abbildung 30 wird eine Induktion von IFN- γ^+ sowie IFN- γ^- Immunantworten korreliert mit dem lokalen und/oder systemischen Vorkommen von als erhöht eingestuften TGF- β 1 Werten.

Nr.	Patienten Nr.	IFN- γ Antwort im ELISpot	Erhöhter TGF- β 1 Wert	Vorkommen erhöhter TGF- β 1 Werte
1	648	IFN- γ^+	-	1/5
2	754		-	
3	808		-	
4	887		-	
5	914		+	
6	667	IFN- γ^-	-	7/10
7	801		+	
8	821		+	
9	851		+	
10	855		+	
11	900		+	
12	902		-	
13	904		-	
14	909		+	
15	920		+	

Tab. 9 Korrelation von erhöhten TGF- β 1 Werten mit der Induktion von IFN- γ Antworten.
 Aufgelistet sind die lokal und/oder systemisch als erhöht eingestuften TGF- β 1 Werte innerhalb von induzierten IFN- γ^+ bzw. IFN- γ^- T-Zellantworten von Mammakarzinom-Patienten.

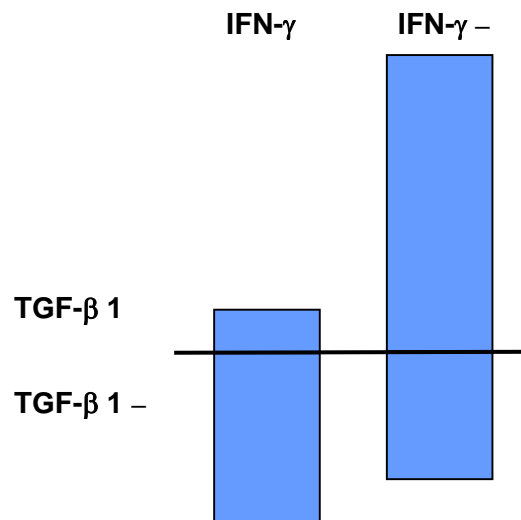


Abb. 30 Korrelation von erhöhten TGF- β 1 Werten mit der Induktion von IFN- γ Antworten.
 Dargestellt ist die Verteilung von lokal und/oder systemisch als erhöht eingestuften TGF- β 1 Werten innerhalb von induzierten IFN- γ^+ bzw. IFN- γ^- T-Zellantworten von Mammakarzinom-Patienten.

Wie aus Tabelle 9 und Abbildung 30 hervorgeht, zeigen die Induktion von IFN- γ positiven T-Zellantworten und das Auftreten von erhöhten TGF- β 1 Werten einen inversen Zusammenhang; so ist im Falle von erhöhten TGF- β 1 Werten die Anzahl an induzierten IFN- γ positiven Immunantworten deutlich reduziert ($p=0,065$).

Immunsuppressive Zytokine im Tumorlysat, das zur TAA-Beladung der DZ verwendet wurde, könnten möglicherweise TH-Antworten auch *ex vivo* während der TZ-Stimulation im ELISpot beeinflussen. Um einen derartigen Einfluss zu untersuchen, wurden Dendritische Zellen übernacht in Gegenwart (10 ng/ml) oder Abwesenheit von TGF- β 1 mit TT oder MCF-7-Lysat beladen und am nächsten Tag mit angereicherten Blut T-Zellen eines gesunden Spenders im ELISpot-Test stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Endobulin und U937-Lysat. TGF- β 1 wurde in doppelter Konzentration des höchsten gemessenen Wertes im Tumorlysat eingesetzt.

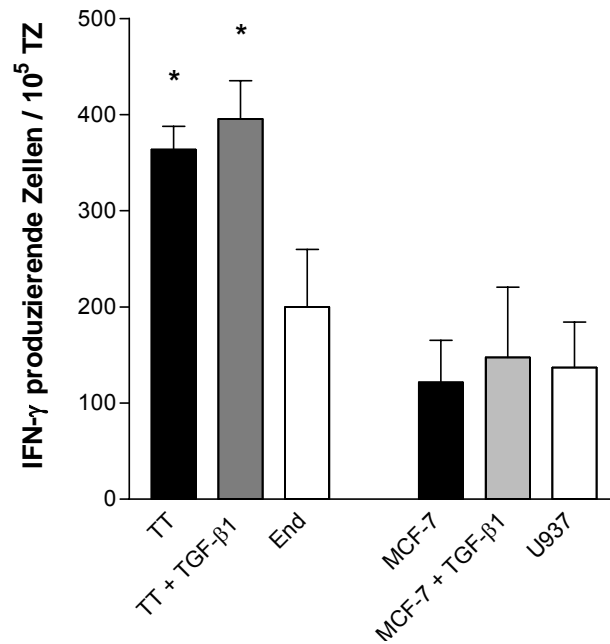


Abb. 31 Einfluss von TGF-β1 auf die INF-γ Induktion stimulierter T-Zellen. Es ist das IFN-γ Sekretionsprofil stimulierter Blut T-Zellen eines gesunden Spenders repräsentativ für 5 Analysen in einem Balkendiagramm dargestellt. Angezeigt ist die Anzahl reaktiver T-Zellen (Mittelwert aus Triplikaten mit Standardabweichung) für eine Gesamtzahl von 10⁵ T-Zellen pro Loch. Angereicherte T-Zellen wurden mit autologen Dendritischen Zellen in einem 40-stündigen ELISpot-Test mit oder ohne TGF-β1 stimuliert, die zuvor übernachtet mit Tetanus Toxoid (TT), Endobulin (End), MCF7-Lysat bzw. mit U937-Lysat beladen worden waren. End und U937 dienten als Negativkontrolle. *, die Anzahl reaktiver T-Zellen ist signifikant höher ($p < 0,05$) als in der Negativkontrolle.

In Abb. 31 ist zu sehen, dass immunsuppressives TGF-β1 keinen Einfluss auf die Induktion einer TH1-Antwort während der TZ-Stimulation im ELISpot hat. So wurde weder eine signifikante TT-spezifische noch MCF-7 Tumorlysat-unspezifische IFN-γ Antwort von in der Kultur anwesendem TGF-β1 gehemmt bzw. reduziert.

Patienten Nr.	PGE ₂ [pg/ml]	ELISpot
	Tumor-Lysat	
754	33,8	IFN- γ , IL-10
667	140	- *
920	365	-
821	415	IL-10
855	666,67	-
902	725	-

Tab. 10 Korrelation des PGE₂ Gehalts in Tumorlysaten mit der im ELISpot induzierten T-Zellantwort. Dargestellt ist eine Auflistung der gemessenen PGE₂ Konzentrationen [pg/ml] in Tumorlysaten von Mammakarzinom-Patienten im ELISA Test sowie zugehörig die induzierten T-Zellantworten im ELISpot. Alle PGE₂ Werte waren erhöht und wurden in rot hervorgehoben (PGE₂ > 13 pg/ml für Tumorlysate). *, das Zytokin IL-4 wurde im ELISpot nicht untersucht.

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist, zeigen alle getesteten Patienten erhöhte PGE₂-Werte im Tumorlysate. Eine INF- γ positive T-Zellantwort wurde nur im Falle der Mammakarzinom-Patientin mit der niedrigsten PGE₂-Konzentration im autologem Tumorlysate induziert. Bei den restlichen Patientinnen, deren Tumorlysate z.T. weitaus höhere PGE₂ Werte aufweisen, zeigten ihre TAA-reaktivierten T-Zellen dagegen keine IFN- γ T-Zellantwort im ELISpot. Die in der Literatur beschriebenen PGE₂-Werte humaner Brustgewebeprobe liegen bei durchschnittlich a) 2 pg/ml für benignes Tumor- bzw. fibrozystisches Gewebe, b) 4 pg/ml für uninvolvertes Gewebe von Brustkrebs-patientinnen, c) 13 pg/ml für malignes, nichtmetastasierendes Tumorgewebe bzw. d) 26 pg/ml für metastasierendes Tumorgewebe (Badawi 2003). Die in den Tumorlysaten gemessenen PGE₂-Konzentrationen liegen im Bereich des in der Literatur beschriebenen biologisch aktiven Wertebereichs von > 0,35 – 35 pg/ml (Dooper et al. 2002, Wu et al. 1998).

Patienten Nr.	IL-10 [pg/ml]	ELISpot
	Tumor-Lysat	
667	0	- *
754	0	IFN- γ , IL-10
801	0	-
920	0	-
902	0,32	-
855	1,33	-

Tab. 11 Korrelation des IL-10 Gehalts in Tumorlysaten mit der im ELISpot induzierten T-Zellantwort. Dargestellt ist eine Auflistung der gemessenen IL-10 Konzentrationen [pg/ml] in Tumorlysaten von Mammakarzinom-Patienten im ELISA Test sowie zugehörig die induzierten T-Zellantworten im ELISpot. Erhöhte IL-10 Werte wurden in rot hervorgehoben (IL-10 > 0 pg/ml für Tumorlysate). *, das Zytokin IL-4 wurde im ELISpot nicht untersucht.

Die Korrelation von IL-10 Konzentrationen der Tumorlysate mit den induzierten T-Zellantworten im ELISpot ergab, dass eine Induktion von IFN- γ nur bei einer Mammakarzinom-Patientin auftrat, deren Tumorlysate kein IL-10 aufwies (Tabelle 11). In den beiden Fällen, in denen das Tumorlysate höhere IL-10 Werte zeigte als in der Literatur beschrieben (Normalwerte für Tumorgewebe: IL-10 = 0 pg/ml) (Ueno 2000), konnten dagegen autologe TAA-spezifische T-Zellen im ELISpot nicht zu einer IFN- γ positiven Immunantwort reaktiviert werden.

Patienten Nr.	IL-12 [pg/ml]	ELISpot
	Tumor-Lysat	
909	0,14	-
855	0,6	-
754	1,04	IFN- γ , IL-10

Tab. 12 Korrelation des IL-12 Gehalts in Tumorlysaten mit der im ELISpot induzierten T-Zellantwort. Dargestellt ist eine Auflistung der gemessenen IL-12 Konzentrationen [pg/ml] in Tumorlysaten von Mammakarzinom-Patienten im ELISA Test sowie zugehörig die induzierten T-Zellantworten im ELISpot. Erhöhte IL-12 Werte wurden in rot hervorgehoben (IL-12 > 0,013 pg/ml für Tumorlysate).

Wie aus Tabelle 12 hervorgeht, enthalten alle drei untersuchten Tumorlysate höhere IL-12 Werte, als in der Literatur für Tumorgewebe beschrieben ist (Normalwerte: $IL-12 \leq 0,013$ pg/ml) (Ueno 2000). Unter ihnen wies nur jene Patientin mit der höchsten IL-12 Konzentration im Tumorlysate TAA-reaktive T-Zellen auf, die im ELISpot eine IFN- γ Antwort induzierten.

Schlussfolgernd scheinen die Ergebnisse der ELISA Experimente mit denen des ELISpot Tests zu korrelieren. Hohe Konzentrationen an immunsuppressiven Zytokinen wie TGF- $\beta 1$, PGE₂ oder IL-10 zeigen eine signifikante inverse Korrelation mit einer Induktion von IFN- γ Antworten im ELISpot. Fasst man die erhöhten Werte aller getesteten immunsuppressiven Zytokine, wie TGF- $\beta 1$, IL-10 und PGE₂, zusammen, so ergibt sich eine signifikante inverse Korrelation ($p=0,004$) mit einer Induktion von IFN- γ Antworten im ELISpot.

Umgekehrt wurde bei der Patientin mit der höchsten IL-12 Konzentration im Tumorlysate eine IFN- γ Antwort durch autologe T-Zellen im ELISpot ausgelöst. Mit Ausnahme von PGE₂ lagen alle gemessenen Zytokinwerte unterhalb der in der Literatur beschriebenen biologisch aktiven Konzentrationen. Da es sich bei den Referenzen jedoch um funktionale Titrationsexperimente *in vitro* handelt, ist es fraglich, ob *in vivo* nicht weitaus geringere Konzentrationen bereits eine biologische Aktivität erzielen. Um eine Korrelation der Expression einzelner Zytokine im Tumorgewebe mit der Polarisation der T-Zellantwort eindeutig nachzuweisen, bedarf es jedoch weiterer Analysen mit einer höheren Patientenzahl. Nichts desto trotz exhibieren Tumorlysate von Brustkrebs-Patientinnen kein bestimmtes, zu verallgemeinerndes Muster ihrer Zytokinprofile, sondern weisen vielmehr starke interindividuelle Unterschiede in Vorkommen und Menge an immunmodulatorischen Zytokinen auf, was sich möglicherweise in der heterogenen Polarisation Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellantworten widerspiegelt.

4.2.6 Untersuchung der Zytokinproduktion von T-Zell-Subpopulationen beim Mammakarzinom

Die ELISpot-Analysen zur Induktionsfähigkeit einer IFN- γ Antwort bei Tumor-spezifischer Reaktivierung von Gedächtnis T-Zellen aus Mammakarzinom-Patienten haben den Nachteil, dass sie keinen Aufschluss zum phänotypischen Charakter der IFN- γ produzierenden T-Zellen geben. Aus diesem Grund sollte der Anteil TAA-spezifischer CD4 und CD8 Knochenmark- bzw. Blut-T-Zellen an der gesamten IFN- γ Sekretion bestimmt werden. Hierfür wurden Knochenmark- bzw. Blut-T-Zellen aus Mammakarzinom-Patienten mit autologen TAA-beladenen Dendritischen Zellen für 48 Stunden stimuliert. Als TAA wurde autologes Tumor- bzw. MCF-7-Lysat und als irrelevantes Antigen zur Negativkontrolle autologes PBMZ- bzw. U937-Lysat verwendet. Am Ende der Stimulationskultur wurden die Zellen gegen CD4, CD8 und gegen intrazelluläres IFN- γ , IL-4 bzw. IL-10 gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

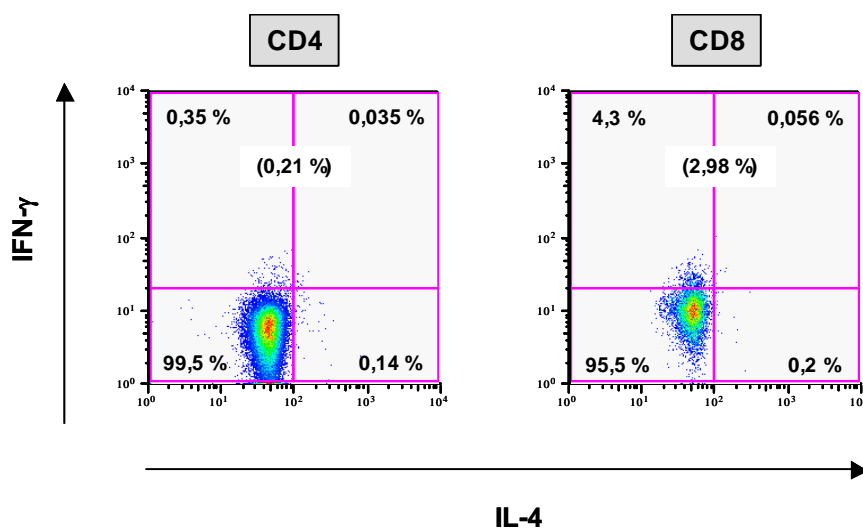


Abb. 32 Zytokinproduktion TAA-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen. Es ist die prozentuale IFN- γ und IL-4 Produktion von TAA-stimulierten CD4 und CD8 Knochenmark T-Zellen aus einer Mammakarzinom-Patientin exemplarisch in einem Punktediagramm dargestellt.

Abbildung 32 stellt exemplarisch die Prozentzahlen TAA-reaktiver IFN- γ produzierender CD4 und CD8 Knochenmark T-Zellen einer Patientin dar.

Die spezifischen Anteile von CD4 und CD8 T-Zellen an der gesamten IFN- γ Produktion sind nach Abzug der Negativkontrolle in Abbildung 33 für Blut- und Knochenmark T-Zellen aller insgesamt vier untersuchten Mammakarzinom-Patienten aufgelistet.

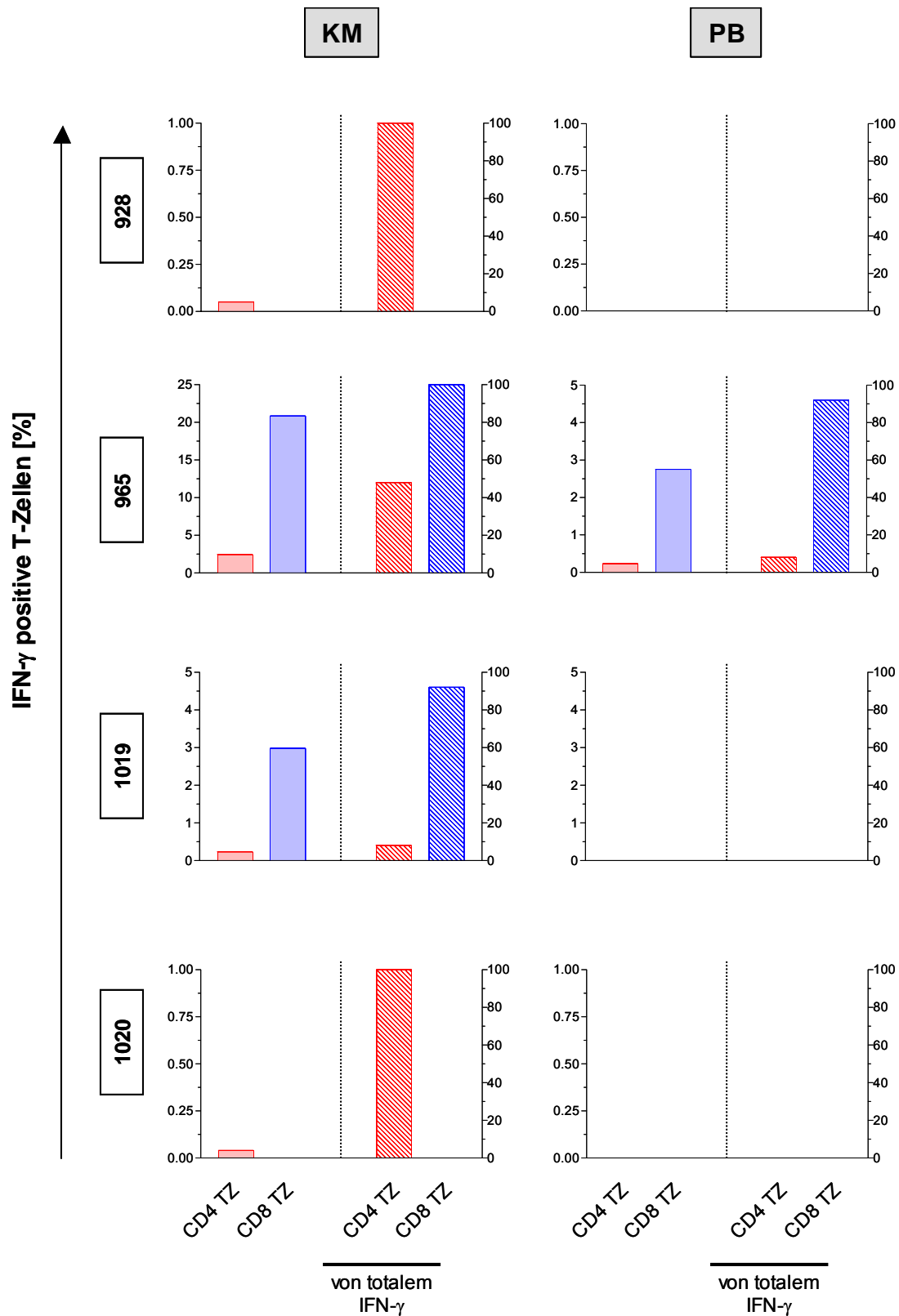


Abb. 33 Spezifische IFN- γ Produktion TAA-reaktiver CD4 und CD8 T-Zellen. Dargestellt ist die spezifische IFN- γ Produktion (linke Y-Achse) sowie der Anteil an totalem IFN- γ (rechte Y-Achse) [%], getrennt durch eine gestrichelte Linie, von TAA-stimulierten CD4 und CD8 T-Zellen (TZ) aus Knochenmark (KM) und Blut (PB) von vier untersuchten Mammakarzinom-Patienten.

Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, zeigen CD4 und CD8 T-Zellen interindividuell starke Schwankungen in den absoluten Prozentzahlen an produziertem IFN- γ (linke Y-Achse) und folglich in ihren Anteilen an totalem IFN- γ (rechte Y-Achse). In allen untersuchten Patienten zeigten die Knochenmark T-Zellen eine spezifische Induktion von IFN- γ . Dagegen ließen sich Blut T-Zellen entweder gar nicht oder in einem schwächeren Ausmaß zur IFN- γ Produktion reaktivieren als Knochenmark T-Zellen. In den Fällen, in denen CD8 T-Zellen eine spezifische IFN- γ Antwort zeigten, lag ihr Anteil an der totalen IFN- γ Produktion weitaus höher als der von CD4 T-Zellen.

Meine vorangegangenen ELISpot-Untersuchungen (siehe 4.2.4) konnten bestätigen, dass TAA-reaktivierte Gedächtnis T-Zellen aus Mammakarzinom-Patienten spezifische TH2-Antworten induzieren können. Es war jedoch weiterhin unklar, inwiefern T-Helferzellen mehrfach polarisierte Immunantworten auslösen können. Daher befasste sich eine weitere Fragestellung mit der Untersuchung einer Polarisierung von CD4 TH-Antworten sowie der Anteile mehrfach polarisierter CD4 T-Zellen. Die absoluten Prozentzahlen von IFN- γ , IL-4 bzw. IL-10 produzierenden CD4 T-Zellen wurden wie oben erwähnt über intrazelluläre Zytokinfärbung ermittelt und mit den Prozentzahlen von IFN- γ^+ IL4 $^+$ bzw. IL-4 $^+$ IL-10 $^+$ doppeltpositiven CD4 T-Zellen verglichen. Es wurden die selben vier Patienten zur Untersuchung herangezogen.

Wie in Abbildung 34 ersichtlich ist, exhibieren TAA-reaktivierte CD4 T-Zellen aus Blut und Knochenmark kein einheitliches Polarisierungsprofil ihrer TH-Antworten. So variieren Auftreten und prozentuale Anteile der einzelnen Zytokine innerhalb der Patienten sowie zwischen den beiden Kompartimenten. Der Anteil mehrfach polarisierter, IFN- γ^+ IL4 $^+$ und IL-4 $^+$ IL-10 $^+$ doppeltpositiver CD4 T-Zellen kann vernachlässigt werden. Somit können IFN- γ , IL-4 und IL-10 ELISpot-Frequenzen zur Bestimmung der Gesamt-TAA-reaktiven T-Zellzahlen addiert werden. Demnach lagen die detektierten ELISpot-Frequenzen von TAA-reaktiven T-Zellen im Knochenmark zwischen 1:588 – 1:9091 und im Blut zwischen 1:247 – 1:20000.

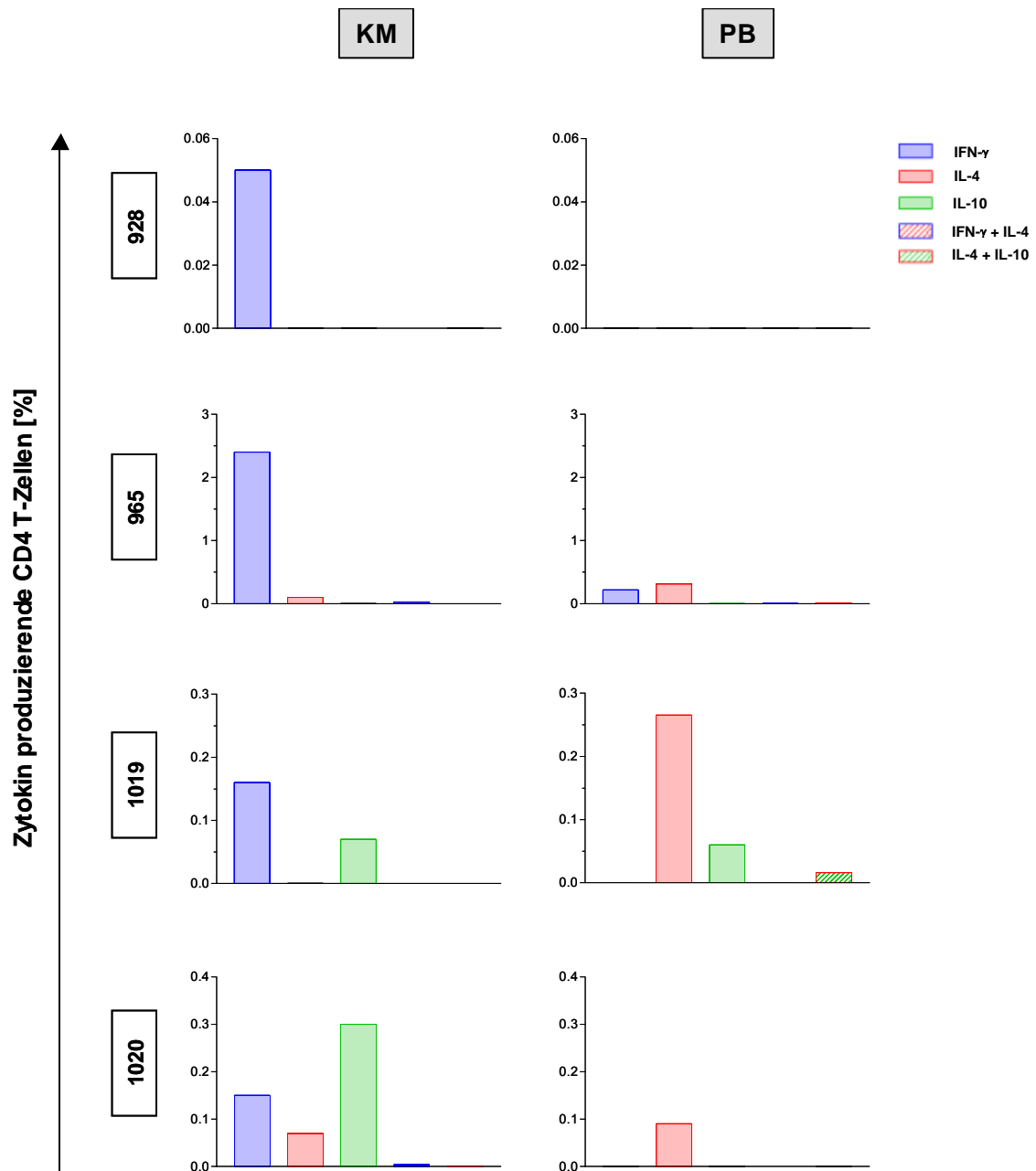


Abb. 34 TH-Polarisierung TAA-reaktiver CD4 T-Zellen. Dargestellt ist die spezifische Induktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 sowie der Anteil an mehrfach polarisierten IFN- γ^+ IL4 $^+$ bzw. IL-4 $^+$ IL-10 $^+$ doppelpositiven CD4 T-Zellen aus Knochenmark (KM) und Blut (PB) von vier untersuchten Mammakarzinom-Patienten nach TAA-spezifischer Reaktivierung.

5 Diskussion

ELISpot-Analysen zu sekundären Gedächtnis TZ-Antworten ergaben, dass eine Stimulation mit dem spezifischen „Recall“-Antigen Tetanus Toxoid sowie dem Superantigen SEB zu der nahezu ausschließlichen Induktion einer sekundären Gedächtniszell-vermittelten IFN- γ Immunantwort führte. Naive, primäre Immunantworten konnten dagegen vernachlässigt werden. Somit konnte für meine nachfolgenden Untersuchungen verifiziert werden, dass mit dem hier verwendeten 40-stündigem Kurzzeit-Stimulationsprotokoll rein sekundäre Gedächtniszell-vermittelte Immunantworten verfolgt werden. Analog waren im IFN- γ Sekretions-Test reaktive Antigen-spezifische T-Zellen wesentlich stärker in der Gedächtnis TZ-Population angereichert als in der naiven bzw. Effektor Zellfraktion. Antigen-spezifisch sowie polykonal stimulierte CD4 und CD8 T-Zellen exhibierten beide eine ähnliche IFN- γ Antwort. Eine IFN- γ Sekretion TZR-stimulierter CD4 und CD8 T-Zellen war weitgehend unabhängig von einem zusätzlichen costimulatorischen Signal.

Diese Daten bestätigen Befunde aus der Literatur, bei denen ebenfalls eine Anreicherung Tumorantigen-spezifischer T-Zellen innerhalb der Gedächtnis Zellpopulation beobachtet werden konnte (Letsch et al. 2003, Beckhove et. al, in revision).

Interessanterweise zeigten hier SEB-stimulierte Gedächtnis T-Zellen eine stärkere IFN- γ Induktion als naive T-Zellen. Dies könnte durch eine stärkere Stimulation von Gedächtnis T-Zellen durch SEB verursacht werden oder in unspezifischer Weise der intrinsisch schnelleren Reaktionsfähigkeit von Gedächtnis T-Zellen zugrunde liegen. Beschriebene Effekte von SEB reichen u.a. von einer Induktion einer Proliferation, massiven Zytokinproduktion und zytotoxischen Aktivität in T-Zellen zu einer Immunsuppression und Toleranz (Blackman and Woodland 1995). So findet eine SEB-induzierte TZ-Aktivierung zu frühen Zeitpunkten statt, mit einer Detektion von TH1-Zytokinen innerhalb der ersten vier Stunden und einem Höhepunkt der Proliferation und zytotoxischen Aktivität zwischen Tag 2 - 4 nach Stimulation. Anschließend folgt eine Phase SEB-induzierter Immunsuppression mit einer starken Deletion der expandierten T-Zellen und einer Anergie-Induktion in verbliebenen T-Zellen. Eine Reaktivierbarkeit von Gedächtnis T-Zellen durch Superantigen-Stimulation wird allerdings bisher kontrovers diskutiert. Während einige Gruppen eine Anergie-Induktion von Gedächtnis T-Zellen nach SEB-Stimulation beobachtet haben, belegen andere die Induktion einer potenten sekundären Immunantwort und einer erhöhten IFN- γ Produktion (rezensiert in Coppola and Blackman

1997). Eine Anergie wurde lediglich in Mausmodellen nicht jedoch bei humanen T-Zellen nachgewiesen.

Vorangegangene Studien haben bewiesen, dass Tumor-spezifische TZ-vermittelte Immunantworten bei Patienten mit Multiplem Myelom induziert werden können. Blut T-Zellen aus MM-Patienten waren in der Lage, in verschiedenen funktionalen Tests autologe Tumorzellen spezifisch zu erkennen und eine Immunantwort zu generieren (Wen et al. 1990, Janson et al. 1991, Moss 1996, Kay 1999). Außerdem korrelierte eine verbesserte Prognose bei MM-Patienten mit der klonalen Expansion von T-Zellen (Brown et al. 1997). Die beim MM expandierten klonalen T-Zellen wiesen dabei den Phänotyp zytotoxischer T-Zellen auf, wurden allerdings nicht auf ihre Spezifität hin untersucht (Raitakari et al. 2000, Sze et al. 2001). Im Gegensatz dazu konnten in anderen Studien Myelom-spezifische Effektorzellen erst nach wiederholter Restimulation *in vitro* detektiert werden (Dhodapkar et al. 2002 und 2003a+b). Allerdings wurden die Studien mit einer weitaus kleineren Anzahl an MM-Patienten (3 bzw. 6) durchgeführt, so dass gegebenenfalls eine Präsenz solcher Zellen in Subgruppen von Patienten nicht detektiert werden konnte. Interessanterweise sind dagegen Patienten mit MGUS (*monoclonal gammopathy of unknown significance*), einer häufigen Vorstufe von malignem MM, in der Lage, zytotoxische und TH-Antworten gegen autologe Knochenmark Plasmazellen zu generieren (Dhodapkar 2003b). Diese Befunde implizieren, dass hohe Frequenzen Tumor-spezifischer T-Zellen während einer Entwicklung von MM generiert werden, sie jedoch im Verlauf der Erkrankung eine negative Modulation erfahren.

Bislang konnte demnach ein Nachweis TAA-reaktiver T-Zellen nur in MGUS-Patienten jedoch nicht in MM-Patienten erbracht werden. Folglich sollte geklärt werden, in welchem Ausmaß TAA-spezifische T-Zellen in MM-Patienten generiert und funktional erhalten werden und inwiefern sich solche Zellen aus Blut und Knochenmark funktional unterscheiden. Als TAA für die Analysen wurde MUC-1 ausgewählt, da es auf den meisten Myelom-Zelllinien und in verschiedenen malignen B-Zellerkrankungen überexprimiert ist und sich zudem für die Vakzinierung von MM-Patienten eignet (Brossart 1999 und 2001). Darüber hinaus konnte für viele andere Myelom-assoziierte Antigene, wie z.B. MAGE-3, NY-ESO und h-TERT, keine spezifische T-Zellantwort in einer begrenzten Anzahl von MM-Patienten induziert werden (Dhodapkar 2002 und 2003). Erst kürzlich wurden zwei aus der Aminosäuresequenz von MUC-1 stammende Peptide, LLLLTVLTV und STAPPAHGV, mit einer hohen Bindungsaffinität zu HLA-A2 identifiziert (Brossart et al. 1999, Soares et al. 1999). Unter Verwendung von LLLLTVLTV-beladenen Dendritischen Zellen als APZ konnten zytotoxische T-Zellen generiert werden, die MUC-1

exprimierende Tumorzellen HLA-A2 restringiert erkennen und zu lysieren vermochten (Brossart 1999, 2001). Bei diesen Versuchen wurden jedoch T-Zellen von gesunden Donoren verwendet und durch wiederholte Stimulation antigenspezifisch expandiert. In ähnlicher Weise konnten nach wiederholten Restimulationen *in vitro* MUC-1 spezifische HLA-nicht-restringierte T-Zellen aus dem Knochenmark von drei MM-Patienten generiert werden (Takahashi et al. 1994, Noto et al. 1997). Bislang blieb allerdings ungeklärt, ob in MM-Patienten MUC-1 spezifische Gedächtnis T-Zellen natürlich vorkommen, die im Verlauf einer Erkrankung generiert und angereichert wurden.

Mit Hilfe einer breiten Untersuchung von insgesamt 83 Myelom-Patienten konnte in dieser Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass MUC-1 spezifische T-Zellen in MM-Patienten generiert werden und im Blut und Knochenmark vorzufinden sind. Die Tetramer-Analysen ergaben, dass ca. 30-40% der MM-Patienten MUC-1 spezifische CD8 T-Zellen enthielten, deren Frequenzen oberhalb des Schwellenwertes von 0,3% gesunder Spender lagen. Die detektierten Frequenzen lagen im Bereich von 0 – 6 %. Es lag eine signifikante Anreicherung MUC-1 spezifischer T-Zellen im Knochenmark vor verglichen zum Blut. Es bestand keine Korrelation zwischen der Frequenz MUC-1 spezifischer T-Zellen und dem Stadium der Erkrankung oder Vortherapie (nicht gezeigte Daten).

Eine analoge Divergenz trat in der funktionalen TAA-spezifischen Reaktivität zwischen Knochenmark- und Blut-T-Zellen auf. Die Frequenzen MUC-1 spezifischer T-Zellen waren im Knochenmark höher und induzierten bei spezifischer Stimulation mit autologen Dendritischen Zellen eine signifikant höhere IFN- γ Antwort verglichen zum Blut. Ebenso konnte eine MUC-1 spezifische zytotoxische Aktivität ausschließlich in T-Zellen aus dem Knochenmark, jedoch nicht aus dem Blut nach einer einzigen Antigen-spezifischen Restimulation mit Dendritischen Zellen *in vitro* induziert werden. Eine intrazelluläre Perforin-Färbung von MUC-1 stimulierten CD8 T-Zellen ergab dabei einen einheitlich höheren Anteil Perforin-positiver CD8 T-Zellen im Knochenmark verglichen zum Blut, wobei die Perforinpositiven Zellen beider Kompartimente in höherem Ausmaße von Gedächtnis T-Zellen repräsentiert wurden. Somit konnte zum ersten Mal belegt werden, dass MUC-1 als autologes TAA im Verlauf einer MM-Erkrankung immunologisch erkannt wird und zur Generierung von Gedächtnis T-Zellen mit einer Anreicherung im Knochenmark der Patienten führt.

In diesem Zusammenhang konnte in Gefrierschnitten von Knochenmarkstanzen multipler Myelom-Patienten eine Ko-Lokalisation von CD8 T-Zellen mit MUC-1 exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Größe und Form der MUC-1 gefärbten Zellen entsprach dabei eher Plasmazytom-Zellen als Erythroblasten, die bekanntlich ebenfalls, wenngleich in geringerem Maße MUC-1 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Brugger et al. 1999). Dieser Befund spricht dafür, dass MUC-1 spezifische CD8 T-Zellen auch *in vivo*

MUC-1 positive Plasmazytom-Zellen erkennen und spezifische Effektorantworten auslösen können.

Die hier erzielten Ergebnisse sprechen allgemein dafür, dass auch bei Patienten mit hämatologischen Tumoren, wie dem MM, im Verlauf der Erkrankung eine spezifische immunologische Auseinandersetzung mit Tumorantigenen stattfindet, die sich in einer Anreicherung solcher Zellen im Knochenmark der Patienten manifestiert.

Überraschenderweise exhibieren T-Zellen des Knochenmarks und nicht des Bluts eine funktionale Kapazität, wenngleich insbesondere das Knochenmark von der malignen Erkrankung bei MM betroffen ist. In ähnlicher Weise konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Anreicherung von Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark von Mammarkarzinom-Patienten nachgewiesen und am malignen Melanom unabhängig bestätigt werden (Feurerer et al. 2001a+b, Letsch et al. 2003). Neuere Studien konnten diesbezüglich belegen, dass auch Patienten mit metastasierten und weit fortgeschrittenen Tumoren, sowie Patienten nach einer adjuvant durchgeführten Chemotherapie und lokaler Nachbestrahlung reaktivierbare, Tumorspezifische Gedächtnis T-Zellen in ihrem Knochenmark anreichern.

Die Bedeutung des Knochenmarks als Reservoir tumorreaktiver Gedächtnis T-Zellen könnte verschiedene Gründe haben. Viele solide und alle hämatologischen Tumore weisen eine Disseminierung einzelner Tumorzellen, oder kleinerer Tumorzellnester im Knochenmark auf. Diese ruhenden Zellen können in einem inaktiven Zustand jahrelang nachgewiesen werden, ohne dass eine klinische Manifestation der Tumorerkrankung auftritt (Yefenof et al. 2001, Schirmacher et al. 2002). Dabei ist ein solcher Zustand oft mit einer langanhaltenden protektiven Immunität assoziiert, die von spezifischen Gedächtnis T-Zellen vermittelt wird (Schirmacher et al. 2002 und 2003, Mahnke and Schirmacher 2003). Es wäre daher denkbar, dass Tumorantigene an T-Zellen im Knochenmark präsentiert werden. Tatsächlich wurde erst kürzlich nachgewiesen, dass Knochenmark-residente Dendritische Zellen eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen sowie eine Reaktivierung von Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark auslösen können (Feurerer et al. 2003). Nicht auszuschließen wäre ebenfalls eine Speicherung von Gedächtnis T-Zellen im Knochenmark, die in peripheren Organen generiert wurden und über Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 in das Knochenmark-Stroma migrieren (Koni et al. 2001, Berlin-Rufenach 1999).

Für die Entwicklung effizienter immuntherapeutischer Strategien basierend auf dem Einsatz Tumor-spezifischer Gedächtnis T-Zellen ist die nähere phänotypische und funktionale Charakterisierung von T-Gedächtnis Subpopulationen relevant, um gegebenenfalls eine gezielte Induktion eines bestimmten T-Gedächtnis Subtyps vornehmen zu können.

Die Untersuchung der Verteilung von CM und EM Gedächtnis T-Zellen innerhalb TAA-spezifischer T-Zellen aus Blut und Knochenmark von Mammakarzinom-Patienten ergab, dass MUC1 und Her-2/neu spezifische CD8 T-Zellen signifikant in der Gedächtnis T-Zellpopulation angereichert waren. TAA-spezifische Gedächtnis T-Zellen waren vermehrt in der EM Subpopulation wiederzufinden. In einem geringeren Ausmaß konnten TAA-spezifische T-Zellen ebenfalls innerhalb der CM- und CD45RA⁺/CD62L⁻ Effektor TZ-Population detektiert werden. Hierbei zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Blut und Knochenmark. Insgesamt wiesen TAA-spezifische Gedächtnis T-Zellen eine ähnliche Verteilung auf die Gedächtnis TZ-Population auf wie die Gesamt-Gedächtnis TZ-Population. Her-2/neu-spezifische Gedächtnis T-Zellen fanden sich allerdings auffällig häufig in der EM TZ-Population. Dies könnte für eine besondere Bedeutung des Her-2/neu Antigens im Rahmen ablaufender Anti-Tumorimmunreaktionen beim Mammakarzinom sprechen.

Die bisher beschriebenen funktionalen Merkmale, in denen sich CM und EM T-Zellen voneinander unterscheiden, beruhen neben verschiedenen Migrationspräferenzen insbesondere auf ihren unterschiedlichen Fähigkeiten, nach geeigneter Stimulation sofortige Effektorfunktionen auszuführen (Sallusto et al. 1999, Masopust et al. 2001, Reinhardt et al. 2001). So sind nach einer kurzzeitigen Stimulation CM T-Zellen durch fehlendes Perforin und eine geringe Produktion an IFN- γ und IL-4 ausgezeichnet, während EM T-Zellen Perforin enthalten und hohe Mengen an verschiedenen Effektorzytokinen produzieren können (Sallusto et al. 1999). Welche Bedeutung der Costimulation bei einer Aktivierung von Gedächtnis T-Zellen zukommt, blieb allerdings bislang unklar. So haben einige Studien einen geringen oder sogar keinen Bedarf an Costimulation für die Erhaltung und Funktion von Gedächtnis T-Zellen nachgewiesen (Bachmann et al. 1999b, Croft et al. 1994, London et al. 2000, Suresh et al. 2001), wohingegen andere wiederum eine Abhängigkeit von costimulatorischen Signalen bei humanen und murinen Gedächtnis T-Zellen während einer Aktivierung (Villegas et al. 1999, Waldrop et al. 1998) oder für die Erhaltung von T-Zellfrequenzen demonstrieren (Iezzi et al. 1998). Wenngleich sich somit mehrere Studien mit dem Einfluss costimulatorischer Signale auf Gedächtnis T-Zellen befasst haben, wurde die Frage nach ihrer Bedeutung für einzelne Subtypen von Gedächtnis T-Zellen bislang nicht untersucht.

Aus diesem Grund sollte geklärt werden, welche Rolle eine Costimulation bei der Induktion einer IFN- γ Antwort von T-Zell-Rezeptor-stimulierten CM und EM T-Zellen spielt. ELISpot-Untersuchungen ergaben dabei, dass die stärkste IFN- γ Induktion in EM T-Zellen durch TZR-Aktivierung mit gleichzeitiger Costimulation erzielt wurde, wenngleich eine niedrigere, jedoch ebenfalls prägnante IFN- γ Produktion auch bei alleiniger T-Zellrezeptor Aktivierung beobachtet werden konnte. Dagegen produzierten CM T-Zellen nach TZR-Aktivierung mit gleichzeitiger Costimulation in geringerem Ausmaß IFN- γ verglichen zu EM T-Zellen. Im Gegensatz zu EM T-Zellen führte eine alleinige TZR-Stimulation zu einer vergleichsweise vernachlässigbaren IFN- γ Induktion in CM T-Zellen. Diese Daten konnten durch analoge Ergebnisse in IFN- γ Sekretionsanalysen bestätigt werden, bei denen im wesentlichen polykonal stimulierte EM T-Zellen eine IFN- γ Antwort induzierten und eine ähnliche IFN- γ Produktion bei alleiniger TZR-Aktivierung sowie zusätzlicher Costimulation erzielt wurde. Folglich war eine IFN- γ Induktion in EM T-Zellen nur wenig von einer Costimulation abhängig im Gegensatz zu CM T-Zellen, die eine stärkere Abhängigkeit von einem costimulatorischem Signal exhibierten. Die unterschiedliche CCR7 Expression und folglich bevorzugte Lokalisation von CM und EM T-Zellen könnte ihren unterschiedlichen Bedarf an B7 costimulatorischen Molekülen erklären und eine Aktivierung in geeigneter Umgebung sicherstellen. So könnten EM T-Zellen durch Pathogen-infizierte Zellen in der Peripherie auch ohne costimulatorisches Signal aktiviert werden, während CM T-Zellen in lymphatischen Geweben Zugang zu aktivierten APZ hätten.

Um die Rolle der Costimulation bei der Aktivierung von CM und EM T-Zellen eingehender zu studieren, wurden Viabilität, Kapazität zur Proliferation und IFN- γ Produktion von CM und EM Gedächtnis T-Zellen in Abhängigkeit von costimulatorischen Signalen analysiert und gegeneinander verglichen. Da die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren mit dem Aktivierungs- und Differenzierungsstatus von Zellen variiert (Reinhardt et al. 2003), wurde außerdem untersucht, ob eine Korrelation zwischen den Ergebnissen und einer Expression des Subpopulation-definierten Chemokinrezeptors CCR7 besteht.

Nach einer Stimulation exhibierten CM T-Zellen zu frühen Zeitpunkten eine Zunahme in der Proliferation, wohingegen EM T-Zellen einen verspäteten Proliferationsschub aufwiesen. In CM T-Zellen war dabei eine zusätzliche Costimulation neben der TZR-Stimulation für eine verstärkte Erhöhung und Verlängerung der Zellproliferation erforderlich, für EM T-Zellen galt dies insbesondere für späte Zeitpunkte (ab Tag 14). Unterschiede in der Proliferation waren in CM T-Zellen stärker von der Art der Stimulation abhängig. CM und EM T-Zellen zeigten nach einer Aktivierung ähnliche Merkmale in phänotypischen und funktionalen Veränderungen. Eine schnelle, dem ursprünglichen Phänotyp gegenläufige Änderung der CCR7 Expression konnte insbesondere nach Aktivierung in Fraktionen beider Gedächtnis Subpopulationen beobachtet werden.

Außerdem waren IFN- γ produzierende CM und EM Effektor T-Zellen zu frühen Zeitpunkten bevorzugt in der CCR7⁻ Fraktion zu finden, reicherten sich aber nachfolgend in der CCR7⁺ Population an. Eine sofortige IFN- γ Produktion innerhalb der ersten zwei Tage durch CCR7 negative Gedächtnis T-Zellen könnte somit eine direkte Protektion vor einer Reinfektion sicherstellen, während gleichzeitig eine extensive Proliferation CCR7 positiver Gedächtnis T-Zellen zur Generierung einer großen Anzahl an sekundären Effektorzellen führen würde. Weiterhin korrelierte die CCR7-Induktion in IFN- γ produzierenden CM und EM T-Zellen mit einer Apoptose der betroffenen Zellen. Die Apoptose-Induktion fiel dabei in aktivierten CM T-Zellen stärker aus als in aktivierten EM T-Zellen.

Meine Daten bestätigen damit vorangegangene Studien, die belegen, dass CM und EM T-Zellen sich in ihrem proliferativem Potential sowie in ihrer allgemeinen Kapazität, sofortige Effektorfunktionen auszuführen, unterscheiden (Sallusto et al. 1999, Geginat et al. 2003). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Unterschiede in Funktion und Viabilität von CM und EM T-Zellen mit der Expression von CCR7 assoziiert waren. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die hier beobachteten Unterschiede in der proliferativen Kapazität zwischen CM und EM T-Zellen ebenfalls mit dem CCR7 Phänotyp korrelieren. Tatsächlich wurde ein derartiger Zusammenhang kürzlich detektiert (Schwendemann et al., submitted). Dabei wurden Proliferation und Funktion eher von dem Anteil CCR7 exprimierender Zellen in beiden Gedächtnis Subtypen nach Aktivierung bestimmt als von dem Phänotyp vor Aktivierung. Aufgrund der hohen Reinheit (>98%) der sortierten CM und EM T-Zellen sind dabei Veränderungen in der CCR7 Expression beider Subpopulationen nicht auf kontaminierende Zellen zurückzuführen. Eine Korrelation zwischen CCR7 Phänotyp und Proliferation könnte ebenfalls die Anreicherung apoptotischer Zellen in der CCR7⁺ Gedächtnis TZ-Fraktion erklären, da Studien zufolge eine höhere Proliferation lymphoider Gedächtnis T-Zellen mit einer Apoptoseinduktion assoziiert war (Wang et al. 2003).

Folglich spielt eine Regulation der CCR7 Expression nicht nur für das Überleben, die Aktivierung und Funktion naiver T-Zellen eine Rolle, sondern ist ebenfalls in der Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von Gedächtnis T-Zellen involviert. Kontroverse Studien bezüglich der Kapazität sofortiger Effektorfunktionen von CM und EM T-Zellen (Sallusto et al. 1999, Unsoeld et al. 2002, Wherry 2003) könnten demnach durch variierende Anteile an CCR7 exprimierenden CM und EM T-Zellen erklärt werden, die in gesunden Spendern und in Mausmodellen stark schwanken können (Schwendemann et al., submitted).

Es sollte beachtet werden, dass CM und EM T-Zellen für ELISpot- und Kinetik-Analysen anhand fehlender CD45RA Expression isoliert wurden. Aufgrund der Fähigkeit mancher

Gedächtnis T-Zellen, CD45RA nach Aktivierung zu re-exprimieren (sog. T_{EMRA}-Zellen), ist es nicht auszuschließen, dass ein kleiner Teil an CD45RA⁺ Gedächtnis T-Zellen bei der Sortierung entfernt wurde (Geginat et al. 2003, Dunne et al. 2002).

Die Frage nach der Konvertibilität von CM und EM T-Zellen aufgrund der Existenz heterogener Gedächtnis Zellpopulationen wird weiterhin kontrovers diskutiert (Baron et al. 2003, Wherry et al. 2003). Befunde, die eine Konversion von CM in EM T-Zellen implizieren (Sallusto et al. 1999, Geginat et al. 2001), führten zum Vorschlag des „progressiven Differenzierungs-Modells“, dem zufolge die Höhe des akkumulierten Signalwerts bei Aktivierung einer naiven T-Zelle, ihre Progression durch hierarchische Schwellenwerte für Proliferation, Differenzierung und Zelltod bestimmt (rezensiert in Lanzavecchia and Sallusto 2002). Unter physiologischen Bedingungen sind T-Zellen dabei einer Reihe immunmodulatorischer Signale (z.B. Zytokine, TZR- und Co-Stimulation) von variabler Dauer ausgesetzt, was in der Generierung von Effektor Gedächtniszellen und nicht-polarisierten CM T-Zellen resultiert, welche terminal differenzierte EM T-Zellen generieren können. Ein solches Modell würde damit eine plausible Erklärung für die Heterogenität induzierbarer T-Zellantworten liefern.

ELISpot-Analysen der Polarisierung Tumor-spezifischer T-Helferantworten beim Mammakarzinom ergaben, dass 76% der Patienten tumorreaktive Gedächtnis T-Zellen ausgebildet hatten, wobei Gedächtnis T-Zellen aus dem Blut (57%) eine höhere Anti-Tumor Reaktivität zeigten als solche aus dem Knochenmark (43%). Die Patienten unterschieden sich allerdings wesentlich in der Art der T-Helferzell-Polarisierung. So konnten bei einem Teil der Patienten lediglich TH2 oder toleranzinduzierende (IL-10) T-Helferzellen nachgewiesen werden, während ein anderer Teil dominante TH1-Antworten exhibierte. Eine phänotypische Analyse ergab hierbei, dass die Anteile von CD4 und CD8 T-Zellen an IFN- γ produzierenden TAA-spezifischen T-Zellen interindividuell stark schwankten. Bei einem weiteren Teil der Patienten wurden dagegen sogar gemischt-polarisierte Immunantworten aus Kombinationen von zwei oder drei Zytokinen induziert. Eine Polarisierung der T-Helferantworten in Blut und Knochenmark fiel zum Teil unterschiedlich aus. So produzierten Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark häufiger und in einem stärkeren Ausmaß IL-4 verglichen mit der Induktion von IL-10. Im Gegensatz dazu zeigten Gedächtnis T-Zellen im Blut häufig ausschließlich IL-10-polarisierte Antworten und induzierten in allen gemischt-polarisierten Immunreaktionen eine Sekretion von IL-10.

Die unterschiedliche Induktion von Toleranz-induzierendem IL-10 zwischen tumorspezifischen Gedächtnis T-Zellen aus Knochenmark und Blut könnte eine Erklärung für ihre unterschiedliche zytotoxische Anti-Tumor Reaktivität liefern (Feuerer et al. 2001b). Aufgrund der stimulatorischen Effekte von TH1 Zytokinen auf die Zell-vermittelte Immunität, im Gegensatz zu stimulatorischen Effekten von TH2 Zytokinen auf humorale Immunantworten, wird ein großes bzw. kleines TH1:TH2-Verhältnis oft als Indikator für eine Aktivierung bzw. Suppression von Zell-vermittelter Immunität betrachtet. Darüber hinaus kann ein solches Verhältnis die Effizienz der Immunantwort gegenüber Tumoren widerspiegeln (rezensiert in Mocellin et al. 2001a). Entsprechend dominierte in Lungenkrebspatienten ein TH2-, gegenüber einem TH1 Immunstatus (Marumo et al. 1999).

Eine phänotypische Untersuchung der Polarisierung von TH-Antworten sowie der Anteile mehrfach polarisierter CD4 T-Zellen anhand intrazellulärer Zytokinfärbung bestätigten die vorangegangenen ELISpot-Untersuchungen. So wiesen auch hier TAA-reaktivierte CD4 T-Zellen aus Blut und Knochenmark kein einheitliches Polarisierungsprofil ihrer TH-Antworten auf. Sowohl Auftreten als auch prozentuale Anteile der einzelnen Zytokine variierten innerhalb der Patienten sowie zwischen beiden Kompartimenten. Entscheidend war jedoch, dass der Anteil mehrfach polarisierter, $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL4}^+$ und $\text{IL-4}^+\text{IL-10}^+$ doppeltpositiver CD4 T-Zellen vernachlässigt werden konnte, so dass die Frequenzen $\text{IFN-}\gamma$, IL-4 und IL-10 produzierender T-Zellen zur Abschätzung der Gesamtzahl TAA-reaktiver T-Zellen eines Patienten annäherungsweise addiert werden können.

Die Anzahl TT-reaktiver gesunder Donoren (74%) lag ähnlich hoch wie die von TAA-reaktiven Mammakarzinom-Patienten (76%). Frequenzen TT- bzw. TAA-spezifischer Gedächtnis T-Zellen wiesen ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede untereinander auf. Allerdings war die Anzahl an Donoren, die in beiden Kompartimenten (Blut und Knochenmark) Antigen-reaktive Gedächtnis T-Zellen enthielten, höher (69%) als bei Mammakarzinom-Patienten (31%).

Der Vergleich der Zytokinprofile zwischen Mammakarzinom-Patienten und gesunden Spendern ergab, dass letztere generell viel häufiger und in einem weitaus größeren Ausmaß $\text{IFN-}\gamma$ induzierten. So zeigten bei allen 16 TT-reaktiven Donoren die Gedächtnis T-Zellen aus dem Blut eine $\text{IFN-}\gamma$ Antwort. Außerdem kamen IL-4 und IL-10 Antworten seltener und weniger stark ausgeprägt vor als bei Mammakarzinom-Patienten. Im Gegensatz zu TAA-reaktiven Mammakarzinom-Patienten wurde somit in allen TT-reaktiven Spendern eine TH1-Immunantwort induziert.

Die Tatsache, dass solide Tumore trotz nachweisbarer Immunreaktionen insensitiv gegenüber einer Anti-Tumor Antwort erscheinen (Coulie et al. 1992), kann zum einen

durch eine mangelhafte Lokalisation Tumorspezifischer T-Zellen am Tumorort bedingt sein, oder im Falle einer Tumor-Infiltration durch spezifische T-Zellen an einer qualitativ oder quantitativ unzureichenden Immunantwort liegen. Darüber hinaus können Tumorzellen einem immunologischen Angriff durch eine Vielzahl an Flucht- und Tarnmechanismen entgehen bzw. entgegenwirken und ihre Sensitivität gegenüber einer Immunreaktion modulieren (Marincola et al. 2000). Die Eigenschaften mancher Zytokine sind hierbei besonders relevant und spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation und Modulation von Immunantworten in der Tumor-Mikroumgebung. Sie sind dabei nicht nur zentrale Mediatoren lymphoider Zell-Interaktionen, sondern können auch von Tumorzellen selbst synthetisiert werden (Wojtowicz-Praga 1997) und als Tumor-Wachstumsfaktoren wirken (z.B. IL-8) oder aufgrund immunregulatorischer Eigenschaften ein Entkommen des Tumors vor dem Immunsystem erlauben (Fujisawa et al. 2000, Marincola et al. 2000). Somit wird die Induktion sowie Natur einer Anti-Tumor Immunantwort in hohem Maße von dem in der Tumor-Mikroumgebung vorherrschenden Zytokinprofil beeinflusst. Breite Untersuchungen von Zytokinen der Tumor-Mikroumgebung sind daher wichtig, um die Physiologie von Tumor-Wirts Interaktionen zu verstehen.

Eine Analyse ausgewählter Zytokine ergab hier, dass sowohl immunsuppressive als auch immunstimulatorische Zytokine im Tumorgewebe von Mammakarzinom-Patienten nachgewiesen werden können, wobei die Zytokinprofile zwischen den einzelnen Patienten stark schwanken und kein allgemeines Muster erkennen lassen. Aufgrund fehlender Literaturangaben für TGF- β 1-Konzentrationen im Tumorgewebe beim Mammakarzinom wurden Werte, die oberhalb des gemittelten Durchschnitts (152 pg/ml) lagen, als relativ erhöht angesehen. In wenigen Fällen lagen TGF- β 1 Plasmawerte gesunder Donoren um einiges höher als der Durchschnitt der übrigen Referenzen; da sie jedoch in einer Kohorte ausschließlich männlicher Probanden gemessen wurden, blieben sie unberücksichtigt. Von allen gemessenen Zytokinwerten erreichte nur PGE₂ die in der Literatur beschriebenen biologisch aktiven Konzentrationen *in vitro*. Es ist jedoch möglich, dass *in vivo* weitaus geringere Konzentrationen bereits eine biologische Aktivität erzielen.

Weiterhin konnte demonstriert werden, dass erhöhte Konzentrationen an immunsuppressiven Zytokinen, wie TGF- β 1, PGE₂ oder IL-10, eine signifikante inverse Korrelation mit einer Induktion von IFN- γ Antworten im ELISpot zeigen. Tumor-vermittelte immunsuppressive Wirkungen von TGF- β 1 könnten dabei auf der Inhibition von TZ-Proliferation und TZ-Differenzierung zu ZTL, TH1- sowie TH2-Zellen beruhen. Ein inhibitorischer Effekt auf T-Zellen ist dabei von ihrem Differenzierungsstatus abhängig und hemmt vollständig differenzierte TH1 Gedächtniszellen stärker als TH2 (Lúdvíksson et al. 2000). Darüber hinaus kann TGF- β 1 die TZ-stimulatorische Kapazität von DZ durch Inhibition von Reifung und Antigenpräsentation reduzieren sowie regulatorische T-Zellen

induzieren (Mocellin et al. 2001a). Eine Tumor-induzierte Produktion von IL-10 kann ebenfalls eine TH1-Antwort durch ähnliche immunsuppressive Eigenschaften wie TGF- β 1 inhibieren. So übt IL-10 eine hemmende Wirkung auf die Produktion von TH1-Zytokinen sowie auf antigenpräsentierende und costimulatorische Eigenschaften von DZ aus und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Termination zellulärer Immunantworten und Induktion humoraler Reaktionen (Mocellin et al. 2001a). In ähnlicher Weise belegen die Mehrzahl an Studien eine starke TH2-induzierende und TH1-inhibitorische Aktivität von PGE₂ auf T-Zellen, Makrophagen, DZ und B-Zellen sowie auf die Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen. PGE₂ hat allerdings keinen hemmenden Einfluss auf die Reifung oder Differenzierung von DZ und übt seine unterschiedlichen Wirkungen durch die Ligation verschiedener Rezeptorsubtypen aus, die unterschiedlich auf Zellen exprimiert werden (rezensiert in Harris et al. 2002).

Im Gegensatz dazu konnte bei der Patientin mit der höchsten IL-12 Konzentration im Tumorlysate eine IFN- γ Antwort durch autologe T-Zellen im ELISpot induziert werden. IL-12 hat stark stimulatorische Effekte auf NK-Zellen und ZTL und spielt eine zentrale Rolle in der Induktion von TH1 Immunantworten. Entsprechend belegen mehrere Studien seine potente Anti-Tumor Aktivität *in vitro* und *in vivo* (Mocellin et al. 2001a). Um eine Korrelation der Expression einzelner Zytokine im Tumorgewebe mit der Polarisierung der T-Zellantwort eindeutig nachzuweisen, sind jedoch weitere Analysen mit einer höheren Patientenzahl erforderlich. Aufgrund des hohen Verbrauchs von Tumorlysate im ELISpot-Test wurden nachfolgende Untersuchungen ausgewählter Zytokine durch die verbliebene Menge an Lysat limitiert, die oft für die Analyse des kompletten Zytokinprofils nicht ausreichte.

Entsprechend der immunregulatorischen und tumorigenen Eigenschaften von TGF- β , IL-10 und PGE₂ belegen eine Fülle von Studien ihre zentrale Rolle in der Tumorummunologie und Tumorentwicklung (Mocellin et al. 2001a, Harris et al. 2002).

Die Bedeutung von TGF- β in der Karzinogenese ist aufgrund seines kontroversen Potentials, als Tumorsuppressor sowie als Pro-Onkogen zu agieren, besonders komplex. Zu den Tumorsuppressiven Wirkungen von TGF- β zählen Inhibition von Tumorzellwachstum, Apoptoseinduktion, Erhaltung genomischer Stabilität, Induktion von Angiogenese-Inhibitoren u.v.m. (Tang et al. 2003). Entsprechend nimmt im Verlauf einer Tumorprogression eine Ansprechbarkeit des malignen Gewebes auf TGF- β ab, was oft mit einer Runterregulation der Expression von TGF- β Rezeptoren korreliert (Krasagakis et al. 1994, Satterwhite and Moses 1994), welche folglich als Anti-Onkogene klassifiziert wurden (de Caestecker et al. 2000). Andererseits weisen viele fortgeschrittene Tumore eine Überexpression von TGF- β auf. Dabei sind oft neben systemischen insbesondere

lokale TGF- β Werte in invasiven Bereichen des Tumors und in Metastasen erhöht und korrelieren mit einer Tumorprogression und Metastasierung. Tang et al. (2003) gelang es schließlich eine kausative Verbindung herzustellen. Sie belegten, dass im Verlauf einer Tumorprogression eine Ansprechbarkeit auf TGF- β abnimmt und sich parallel dazu eine Tumor-suppressive Signalwirkung von TGF- β in eine pro-metastatische umkehren kann. TGF- β kann durch viele verschiedene Zellen am Tumorort produziert werden (z.B. Tumorzellen, T- und NK-Zellen, Epithel- und Stromazellen). Seine pro-metastatischen Effekte beruhen neben einer Immunsuppression auf einer Erhöhung der Beweglichkeit und Invasivität von Tumorzellen und Begünstigung von Angiogenese (Mocellin et al. 2001a).

Die Rolle von IL-10 in der Tumorentwicklung wird weiterhin kontrovers diskutiert. Für viele humane Tumore bzw. Tumorzell-Linien konnte eine Expression von IL-10 mRNA bzw. Protein nachgewiesen werden (Mocellin et al. 2001a). Viele Berichte unterstützen daher die Hypothese, dass IL-10 aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung von Tumoren als Fluchtmechanismus vor dem Immunsystem sezerniert wird. Entsprechend zeigten fortgeschrittene Tumore eine TH2-Zytokinexpression und unterdrückte DZ-Funktion, während solche mit einem dominanten TH1-Zytokinmuster und normaler DZ-Aktivität eine Ansprechbarkeit auf eine Immunochemotherapie exhibierten (Enk et al. 1997). In einer anderen Studie verhinderte eine IL-10-Produktion von Tumorzellen ihre TIL-vermittelte Lyse, wobei diese Inhibition mit neutralisierenden anti-IL-10 Antikörpern umgekehrt werden konnte (Kim et al. 1995). Weitere Befunde, wie die Runterregulation akzessorischer Moleküle (HLA, ICAM), die funktionale Inhibition von TAP sowie eine Erhöhung der Proliferation von Tumorzellen durch IL-10, unterstützen ebenfalls diese Hypothese (Yue et al. 1997, Petersson et al. 1998). Schließlich wurde auch eine negative Korrelation zwischen IL-10 Produktion und Prognose in Patienten mit Kolorektalen Karzinomen und Lymphomen beschrieben (Bohlen et al. 2000, Shim et al. 1999). Eine kürzlich beschriebene anti-tumorigene Wirkung von IL-10 wurde auf eine Aktivierung von NK-Zellen und die Inhibition von Angiogenese bzw. Invasivität durch Aktivierung von Metalloproteinase-Inhibitoren zurückgeführt (rezensiert in Mocellin et al. 2003).

PGE₂ spielt neben der Regulation von Inflammation und Immunantworten ebenfalls eine wichtige Rolle in der Tumorprogression. Es kann von einigen malignen Zellen selbst produziert werden und wurde in erhöhten Konzentrationen in mehreren Tumorgeweben nachgewiesen. Tumorigene Wirkungen von PGE₂ beruhen u.a. auf einer Inhibition von Tumorzell-Apoptose, Induktion von Tumorzellproliferation und Erhöhung der Beweglichkeit und Migration von Tumorzellen. Weiterhin wirkt es stimulierend auf die Produktion von MMPs und auf Angiogenese, die beide eine Tumorprogression günstig beeinflussen (Harris et al. 2002).

Die inverse Korrelation zwischen erhöhten immunsuppressiven Zytokinwerten im Tumorsysat und der Induktion von TH1-Antworten impliziert, dass das vorherrschende Milieu der Tumorumgebung bei einer tumorspezifischen Aktivierung einen Einfluss auf infiltrierende DZ und ihre nachfolgende Polarisierung von TZ-Antworten hat.

Dies ist plausibel, da die DZ-vermittelte Induktion von TH1-, TH2- oder regulatorischen Immunantworten insbesondere durch Signale aus der Umgebung reguliert werden kann (Kaliński et al. 1999). Es wird daher angenommen, dass eine umgebungsbedingte Modulation der Kapazität IL-12 zu produzieren während der Entwicklung und finalen Reifung von DZ einen wichtigen Regulationsmechanismus für die Polarisierung von TH-Antworten darstellt (Lanzavecchia and Sallusto 2000a).

Eine Vielzahl an Faktoren haben einen direkten bzw. indirekten Einfluss auf die IL-12 Produktionsfähigkeit von DZ. So spielen das Zytokinprofil, Signale von T-Zellen, Art des Pathogens sowie die Stärke der TZR-Signalwirkung, bedingt durch die Dosis und Affinität des TZR-Liganden sowie durch das Ausmaß der Costimulation, eine wichtige Rolle bei der Polarisierung von T-Zellen (Kaliński et al. 1999, Lanzavecchia and Sallusto 2000a). Beispielsweise wird eine IL-12 Produktion und nachfolgende TH1-Induktion durch die meisten Pathogene ausgelöst und durch IFN- γ , IFN- α , IL-18 und CD40L-Signale verstärkt, während andere Reifungsstimuli wie TNF- α , IL-1, Choleratoxin, Masernvirus, PGE₂, Vitamin D₃, extrazelluläres ATP sowie Steroide und OX40L-Signale eine TH2-Immunantwort induzieren (Lanzavecchia and Sallusto 2000a, Liu et al. 2001). IL-10 unterscheidet sich von diesen Faktoren insofern, als es neben der Produktion von IL-12 ebenfalls die stimulatorische Kapazität von DZ inhibiert und folglich tolerogene DZ mit residualer TH2-fördernder Funktion induziert (Lanzavecchia and Sallusto 2001). Unter bestimmten Bedingungen können außerdem auch inflammatorische Chemokine, die von aktivierten DZ in hohem Maße produziert werden und die Rekrutierung von Monozyten induzieren, selektiv inhibitorisch auf eine IL-12 Produktion wirken (Braun et al. 2000). In reifen DZ ist dagegen eine Anfälligkeit gegenüber modulierenden Faktoren entweder verloren oder stark reduziert (Kaliński et al. 1999).

Weiterhin gelten die Kinetik der DZ-Aktivierung und die Art des DZ-Subtyps als Faktoren zur Modulation einer TH-Polarisierung. Nach einer Aktivierung produzieren DZ IL-12 nur in einem kleinen Zeitfenster von 8-16 Stunden, so dass lediglich kürzlich aktivierte DZ TH1-Antworten induzieren, während „erschöpfte“ (*exhausted*) DZ zu späteren Zeitpunkten (>24h) generell TH2-Zytokine produzieren. Somit würde eine zeitliche Beschränkung der IL-12 Produktion sowie die kurze Lebensspanne von DZ die zeitliche Modulation von TH1 und TH2 Antworten regulieren und das Auftreten unterschiedlich differenzierter T-Zellen erklären (Lanzavecchia and Sallusto 2001).

Die Fähigkeit von DZ TH1-, TH2-Immunantworten oder Toleranz zu induzieren hat die Frage nach der Existenz verschiedener DZ-Subtypen mit unterschiedlichen intrinsischen TZ-stimulatorischen Kapazitäten aufgeworfen. Tatsächlich konnten vorangegangene Studien verschiedene DZ-Subtypen mit unterschiedlichen Implikationen zu TH-Polarisierungskapazitäten identifizieren, wonach myeloide DZ bevorzugt TH1- und plasmazytoide DZ TH2-Antworten induzieren (Lanzavecchia and Sallusto 2001). Ebenso belegen Unterschiede in der bevorzugten Lokalisation, der Phagozytose-Fähigkeit sowie der Antigenspezifität, durch die Expression verschiedener Rezeptoren (z.B. Toll-like-Rezeptoren, Lektin-Rezeptoren, CD1), eine substantielle Spezialisierung einzelner DZ-Linien, die unabhängig vom Reifezustand der DZ sind. Allerdings wird diese Hypothese kontrovers diskutiert, nicht zuletzt durch den Befund, dass individuelle DZ-Subpopulationen je nach instruierenden Aktivierungssignalen aus der Umgebung, einen TH1-, TH2- oder regulatorischen T-Zell-Induktions-Phänotyp annehmen können (Shortman and Liu 2002).

Bislang wird jedoch das Zytokinmilieu der Mikroumgebung bei einer Dendriten-Aktivierung als einer der wichtigsten modulatorischen Faktoren für eine Polarisierung von TZ-Antworten angesehen und spielt neben pathologischen Bedingungen auch in gesundem Gewebe eine wichtige Rolle. So wurde eine Gewebe-spezifische Polarisierung von DZ für mehrere Kompartimente belegt, wie u.a. für das Auge, Peyer's Patches, Atemwege und die Leber, deren DZ präferentiell eine TH2-Differenzierung induzieren, während dagegen beispielsweise DZ aus der Milz oder Haut bevorzugt TH1-Antworten auslösen. Die funktionale Divergenz zwischen Gewebe-spezifischen DZ beruht dabei auf einer unterschiedlichen Zytokin-Mikroumgebung in den Geweben. So ist beispielsweise eine konstitutive IL-10 und TGF- β Produktion im Auge für die bevorzugte Induktion von TH2-Antworten verantwortlich (Shortman and Liu 2002, Kaliński et al. 1999).

Interessanterweise scheint eine Korrelation zwischen dem zeitlichen Bestehen eines Tumors und der Induktion einer Immunantwort zu existieren. So konnte in Maustumor-Modellen demonstriert werden, dass länger etablierte Tumore, die über mehr Zeit für den Aufbau einer „Beziehung“ zu ihrer Umgebung verfügten, resistenter gegenüber einer Vakzine-vermittelten Abstoßung waren verglichen mit kürzer etablierten Tumoren, selbst wenn sich beide Tumore in derselben Maus befanden (rezensiert von Pérez-Díez and Marincola 2002). Dies schließt die Induktion einer systemischen Toleranz oder Immunsuppression aus und lässt einen entscheidenden Einfluss der Tumorgroße und der Tumor-Mikroumgebung auf eine Immunantwort vermuten. Eine solche Implikation bekräftigt die oben diskutierte Relevanz des Zytokinmilieus und der progressionsbedingten Ansprechbarkeit von Tumoren.

Es bleibt weiterhin kontrovers, welche Bedeutung natürliche Schwankungen systemischer Zytokinwerte haben und ob sie mit den lokalen Werten in der Tumor-Mikroumgebung korrelieren. Plasmawerte von TH2-Zytokinen sind in einer hohen Prozentzahl fortgeschrittener Tumore erhöht und zeigen eine inverse Korrelation mit einer guten Prognose (Wittke et al. 1999, Bohlen et al. 2000, Shim et al. 1999). Deshalb wurde postuliert, dass ein systemisches Ungleichgewicht im TH1:TH2-Verhältnis einen immunsuppressiven Zustand induzieren könnte, der zu einer Krebsprogression führt. Andere Studien dagegen berichteten von einer Korrelation zwischen hoher TH2-Zytokin-Konzentrationen im Plasma und einer verbesserten Prognose (Knabbe et al. 1996, Kong et al. 1999). Letztendlich lassen sich jedoch anhand systemischer TH2-Zytokinwerte keine überzeugenden Voraussagen klinischer Resultate machen (Wakefield et al. 1995, Cortes et al. 1995). Die eigenen Daten deuten darauf hin, dass in den untersuchten Fällen nicht die Plasmakonzentration, sondern die Konzentration der Zytokine im Tumor selbst wichtig ist.

Eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen findet nach klassischer Sicht in sekundären lymphatischen Geweben statt (Janeway and Travers 2001). Sie kann einer neueren Studie zufolge jedoch ebenfalls im Knochenmark, einem primären lymphatischen Organ, erfolgen (Feurerer et al. 2003). Dagegen kommt eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen in peripheren Geweben in der Regel nicht zustande, eventuell aufgrund ihrer mangelnden Fähigkeit in periphere nicht-lymphoide Gewebe einzutreten (Kaliński et al. 1999, Beckhove et al. 2003). Des weiteren können Faktoren, wie disruptive Effekte von Kollagen auf die immunologische Synapse, Interaktionen zwischen T-Zellen und APZ in peripherem Gewebe limitieren. Solche Faktoren scheinen in lymphoiden Geweben keinen sonderlichen Einfluss zu haben (Lanzavecchia and Sallusto 2001). Eine Ausnahme dieser Regel stellt eine Studie dar, bei der eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen im Tumor mit einer nachfolgenden Tumorabstoßung nachgewiesen werden wurde (Yu et al. 2004). Dies erforderte jedoch eine forcierte Expression von LIGHT im Tumor, einem TZ-costimulatorischen Molekül, das zudem die Produktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen im Tumorgewebe hochreguliert.

Folglich kann man davon ausgehen, dass bei Patienten mit soliden Tumoren eine TAA-spezifische primäre Aktivierung naiver T-Zellen in dränierenden Lymphknoten und/oder im Knochenmark stattfindet. Das Knochenmark ist der häufigste distale Zielort für Brusttumormetastasen (Wiseman and Werb 2002). Viele Faktoren, die eine Knochenentwicklung regulieren, sind ebenfalls in der Regulation der Brustentwicklung involviert. Dieser Zielort könnte für Mammakarzinomzellen vorteilhaft sein, da das Stroma im Knochenmark viele Eigenschaften mit dem im Brustdrüsengewebe teilt. So ist das

Knochenmark fettreich und gut durchblutet und Stromazellen exprimieren viele Hormone, Überlebens- und Wachstumsfaktoren, die ebenfalls für das Wachstum und die Entwicklung von Brustzellen wichtig sind (Wiseman and Werb 2002). Somit könnte eine primäre TZ-Aktivierung durch TAA-präsentierende residente DZ vermittelt werden, die disseminierte Tumorzellen phagozytiert haben.

Allerdings könnte eine Induktion primärer T-Zellantworten in Lymphknoten und Knochenmark unterschiedlich ausfallen, da die in Lymphknoten einwandernden DZ in einer unterschiedlichen Mikroumgebung aktiviert wurden als Knochenmark residente DZ. So könnte die Tumor-Mikroumgebung beispielsweise durch eine erhöhte Sekretion an immunregulatorischen Zytokinen eine DZ-Polarisierung in Richtung TH2-stimulatorischer Kapazität beeinflussen, während dagegen vereinzelt Tumorzellen im Knochenmark keine derartige Modulation ausüben könnten und daher die Induktion von TH1-Antworten erlauben würden. Eine solche Annahme zieht weiterhin die Frage nach sich, ob die Lokalisation der primären Immunantwort in verschiedenen lymphatischen Geweben mit der Verteilung von Gedächtnis T-Zellen korreliert. Hierzu konnten Mullins et al. (2003) demonstrieren, dass die Verteilung von CD8 Gedächtnis T-Zellen durch das Kompartiment definiert wurde, in dem die ursprüngliche primäre TZ-Aktivierung stattfand. Eine unterschiedliche Kompartiment-spezifische Induktion von TH-Antworten, bedingt durch modulatorische Einflüsse aus der Mikroumgebung, sowie eine bevorzugte Lokalisation solcher induzierten Gedächtnis T-Zellen am initialen Aktivierungsort würden erklären, wieso aus dem Knochenmark von Mammakarzinom-Patienten isolierte TAA-reaktivarbare Gedächtnis T-Zellen in geringerem Ausmaß IL-10 polarisierte Immunantworten im ELISpot induzieren verglichen mit jenen, die aus dem Blut isoliert wurden.

Die im ELISpot induzierten TH-Antworten könnten dabei allerdings auch *ex vivo* während der TZ-Stimulation mit TAA-beladenen DZ, aufgrund des Gehalts an immunsuppressiven Zytokinen im Tumorsat beeinflusst werden. Vergleichsanalysen, in denen T-Zellen mit TAA-beladenen DZ in Gegenwart bzw. Abwesenheit erhöhter TGF- β Konzentrationen stimuliert wurden, zeigten keinen Beleg für einen derartigen Einfluss (unveröffentlichte Beobachtungen aus dem eigenen Labor).

Neben Tumorzellen oder konditioniertem Tumorstroma sind auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen) in der Lage, über eine Induktion immunsuppressiver Zytokine eine DZ-Polarisierung zu modulieren (Dieckmann et al. 2001, Wiseman and Werb 2002). So waren T_{reg}-Zellen im Blut von Patienten mit Mamma- und Pankreas-Karzinom erhöht und induzierten eine Sekretion von TGF- β und IL-10, was eine Proliferation und IFN- γ Sekretion aktivierter T-Zellen inhibierte. Weiterhin wurde bei verschiedenen soliden

Tumoren die Fähigkeit von T_{reg} -Zellen demonstriert, Tumore und dränierende Lymphknoten zu infiltrieren (rezensiert in Liyanage et al. 2002). Folglich wären T_{reg} -Zellen in der Lage, eine DZ-Polarisierung sowohl am Tumorort sowie in dränierenden Lymphknoten zu beeinflussen.

Darüber hinaus können T_{reg} -Zellen sogar eine Differenzierung nicht-tolerogener TH-Zellen in T_{reg} -Zellen induzieren, die TH-Antworten in einer TGF- β und IL-10 abhängigen Weise *in vitro* supprimierten. Dies könnte die Beobachtung erklären, warum unter manchen Krankheitsbedingungen, sowohl $CD25^+$ sowie $CD25^- CD4^+$ T-Zellen eine Zytokin-abhängige Suppression vermitteln können (Bluestone and Abbas 2003).

Neben einer inhibitorischen Wirkung auf TH1-Antworten können T_{reg} -Zellen weiterhin über eine IL-10 Produktion die Hochregulation des anti-apoptotischen Faktors SPI-6 (*Serine-Protease-Inhibitor 6*) in DZ inhibieren. Dieser Faktor dient als Schutz vor ZTL-vermittelter Lyse und Apoptose (Medema et al. 2001). Dadurch würde eine TZ-Stimulation vorzeitig beendet.

Aufgrund der Fähigkeit von T_{reg} -Zellen, IL-10 zu sezernieren sowie konstitutiv CD45RO zu exprimieren (Liyanage et al. 2002), könnte ein Teil der in ELISpot-Analysen und intrazellulären Zytokinfärbungen detektierten IL-10 $^+$ Zellen T_{reg} -Zellen darstellen.

Ein weiterer Mechanismus zur Suppression von TZ-Antworten ist die Antigenspezifische Stimulation naiver T-Zellen durch unreife DZ in Abwesenheit costimulatorischer Moleküle, was generell in einer TZ-Anergie resultiert. Dieses Phänomen tritt zumeist aufgrund einer fehlenden Aktivierung von DZ bei der Präsentation von peripheren Selbst-Antigenen auf. So verhindert die Aufnahme autologer apoptotischer Zellen, jedoch nicht autologer nekrotischer Zellen, eine Aktivierung und Reifung von DZ (Sauter et al. 2000, Basu et al. 2000). Entsprechend konnten Huang et al. (2000) einen DZ-Subtypen identifizieren, der apoptotische intestinale Epithelzellen zu Lymphknoten transportierte und bei der Induktion von TZ-Toleranz gegen Gewebeantigene impliziert war. Eine Generierung von T_{reg} -Zellen durch DZ im Kontext von Autoantigenen konnte ebenfalls in anderen Studien nachgewiesen werden (Jonuleit et al. 2001). Somit wäre eine Induktion immunsuppressiver T_{reg} -Zellen durch unreife TAA-präsentierende DZ, die apoptotische Tumorzellen aufgenommen haben, denkbar. Solche T_{reg} -Zellen wären wiederum in der Lage, über ihre Fähigkeit Tumore und Lymphknoten zu infiltrieren, an diesen Orten eine DZ-Polarisierung zu modulieren. Des weiteren können apoptotische Zellen über Phosphatidylserin-Exposition eine TGF- β Produktion in Makrophagen auslösen (Gorelik and Flavell 2002).

Folglich könnte die Untersuchung eines breiten Spektrums an Zytokinen in der Tumor-Mikroumgebung zu relevanten Zeitpunkten einer Tumorentwicklung, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Komplexität von Tumor-Immun Interaktionen liefern.

Dazu gehören neuere Studien, bei denen Aspirate aus malignen Läsionen (*serial fine-needle aspirates*, *FNAs*) für direkte Untersuchungen solcher Interaktionen innerhalb der Tumor-Mikroumgebung herangezogen werden (Wang and Marincola 2000, Riker et al. 1999, Panelli et al. 2000). Mit Hilfe der cDNA Mikroarray Technologie wurde das Genexpressions-Profil in FNA-Material aus Melanommetastasen von Patienten analysiert, die einer IL-2 basierten Immuntherapie unterzogen wurden. Die Untersuchung ergab in Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen, dass verschiedene Tumorproben ein heterogenes Zytokinprofil aufwiesen, welches nicht mit klinischen Resultaten in Verbindung gebracht werden konnte. Außerdem zeigte sich, dass die vor einer Behandlung gemessenen IL-10 mRNA Werte in jenen Patienten mit metastasierendem Melanom signifikant höher waren, die auf eine Peptidvakzinierung mit IL-2 ansprachen. Dabei konnte die IL-10 mRNA Expression auf Tumorzellen zurückgeführt werden. Dagegen bestand keine Korrelation zwischen der TGF- β mRNA Expression und einer Ansprechbarkeit auf die Immuntherapie (Mocellin et al. 2001b), wobei eine Rolle von TGF- β bei einer Anti-Tumor Immunantwort hier trotzdem nicht ausgeschlossen werden kann, da Analysen der Transkriptionswerte nicht die Verfügbarkeit von bioaktivem TGF- β durch extrazelluläre Proteasen berücksichtigt. Eine Analyse der IFN- γ mRNA Expression in den Tumoraspiraten ergab, dass ansteigende IFN- γ Transkriptionswerte während der Behandlung mit einer Ansprechbarkeit der Patienten korrelierte (Mocellin et al. 2001b). Darüber hinaus gab es einen Zusammenhang zwischen Variationen im Gehalt von IFN- γ und TH2 Zytokinen (IL-10 und TGF- β), wobei ein TH1 Zytokinprofil mit einer Tumorregression einherging, während ein TH2 Zytokinprofil in fortschreitenden Metastasen beobachtet werden konnte.

Melanommetastasen, die auf eine Immuntherapie mit einer kompletten Regression ansprachen, exhibierten trotz ihrer Heterogenität ein unterschiedlicheres genetisches Expressionsprofil als diejenigen, die keine Reaktion zeigten. Es schien dabei, dass eine Immun-Ansprechbarkeit der Tumore bereits vor einer Behandlung vorherbestimmt und mit der Überexpression bestimmter Gene in den Melanomzellen, darunter IL-10, assoziiert war (Wang et al. 2002, Mocellin et al. 2001b). Wenngleich IL-10 ein sehr potentes immunsuppressives Zytokin ist, konnte seine Tumor-regressive Wirkung durch Stimulation der Aktivität von NK-Zellen belegt werden (Salazar-Onfray et al. 1995, Zheng et al. 1996). Entsprechend könnte eine IL-10 Produktion durch Tumorzellen diese im Falle einer Immunisierung nachfolgend anfällig für eine NK-vermittelte Zerstörung machen.

Diese Ergebnisse implizieren, dass Tumorzellen tumorogene Faktoren sezernieren können, die eine Tumorprogression direkt oder indirekt unterstützen, allerdings gleichzeitig unter bestimmten Bedingungen eine Immunantwort positiv beeinflussen. Dies könnte analog auch für andere tumorogene Faktoren, wie für die Proteasen Heparanase und Hyaluronidase gelten, die durch Freisetzung pro-angiogener und inflammatorischer Moleküle bei ihrer Spaltung von Proteoglykanen, neben einem Tumor-progressiven Effekt zugleich pro-inflammatorische Nebenwirkungen induzieren können (Vlodavsky and Friedmann 2001).

Die obengenannten Zytokine gehören zu den am besten studierten im Bereich der Tumorimmunologie. Zieht man allerdings in Betracht, dass bislang mehr als 150 Zytokine bekannt sind (Thomson 1998), ist eine Beteiligung anderer Zytokine an der Regulation von Tumor-Immun Interaktionen in der Tumor-Mikroumgebung wahrscheinlich. Hinzu kommt die Komplexität der *in vivo*-Regulation von Zytokinaktivitäten, die durch das Zusammenspiel vielfacher variierender Faktoren verursacht wird, wie z.B. die Aktivierung latenter Liganden, der Expression von Rezeptoren und der Modulation von Signaltransduktionskaskaden.

Die Befunde unterstreichen, dass es sich bei der Tumor-Mikroumgebung um ein dynamisches, flexibles und hoch komplexes System handelt, das durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Aller Wahrscheinlichkeit nach werden Tumor-Immun Interaktionen mehr durch ein definiertes Gleichgewicht im Zytokinprofil innerhalb der Tumor-Mikroumgebung beeinflusst als durch absolute Werte eines einzelnen Zytokins selbst. Allerdings muss der Nachweis eines bestimmten Zytokinprofils in Therapie ansprechenden Tumoren keine kausative Signifikanz besitzen, sondern kann lediglich die Lokalisation einer effektiven Immunantwort am Tumorort widerspiegeln. Letztlich könnte auch eine Modulation der Zytokinrezeptor-Expression und nicht der Zytokine selbst das Resultat einer Immunantwort bestimmen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass bei Krebspatienten Tumor-spezifische Gedächtnis T-Zellen im Verlauf einer Tumorerkrankung generiert und erhalten werden. Dies konnte sowohl für einen soliden Tumor, das Mammakarzinom, als auch für eine hämatologische Neoplasie, das Multiple Myelom, verifiziert werden. Dabei konnte zum ersten Mal belegt werden, dass im Verlauf einer MM-Erkrankung MUC-1 als autologes Tumor-assoziiertes Antigen immunologisch erkannt wird und zur Generierung von Gedächtnis T-Zellen mit einer Anreicherung im Knochenmark der Patienten führt.

Weiterhin konnte eine Anreicherung TAA-spezifischer Gedächtnis T-Zellen innerhalb der EM Zellpopulation bei Mammakarzinom-Patientinnen demonstriert werden. Die Analyse der Funktionalität und Langlebigkeit von EM und CM T-Zellen im Hinblick auf ihre klinische Relevanz zeigte wesentliche Unterschiede zwischen beiden Gedächtniszell-Populationen. So war eine IFN- γ Induktion und Proliferation in CM T-Zellen in stärkerem Ausmaß von einer zusätzlichen Costimulation abhängig verglichen zu EM T-Zellen. Außerdem fiel eine Apoptose-Induktion in CM stärker aus als in EM T-Zellen. Unterschiede in Funktion und Viabilität von CM und EM T-Zellen korrelierten dabei mit der Expression des Chemokinrezeptors CCR7.

ELISpot-Analysen der Polarisierung induzierter TH-Antworten beim Mammakarzinom ergaben eine große Heterogenität zwischen den Patienten. So exhibierte ein Teil der Patienten dominante TH1-Antworten, während bei einem anderen Teil lediglich TH2- oder toleranzinduzierende IL-10-Antworten induziert werden konnten. Darüber hinaus traten auch gemischt-polarisierte TH-Antworten auf.

Eine Analyse ausgewählter Zytokine resultierte in der Detektion immunsuppressiver und immunstimulatorischer Zytokine im Tumorgewebe, wobei die Zytokinprofile interindividuell stark schwankten und kein einheitliches Muster erkennen ließen. Interessanterweise bestand jedoch eine inverse Korrelation zwischen der Induktion einer TH1-Antwort im ELISpot und dem erhöhten Vorkommen immunsuppressiver Zytokine im autologen Tumorgewebe von Mammakarzinom-Patienten. Eine derartige Korrelation impliziert, dass das vorherrschende Milieu der Tumorumgebung bei einer tumorspezifischen Aktivierung einen Einfluss auf infiltrierende Dendritische Zellen und ihre nachfolgende Polarisierung von T-Zellantworten hat. Folglich könnte die Untersuchung eines breiten Spektrums an Zytokinen in der Tumor-Mikroumgebung zu relevanten Zeitpunkten einer Tumorentwicklung, einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Tumor-Immun Interaktionen liefern.

7 Literaturverzeichnis

Acres B, Apostolopoulos V, Balloul J, Wreschner D, Xing P, Ali-Hadji D, Bizouarne N, Kieny M, McKenzie I, MUC-1 specific immune responses in human MUC-1 transgenic mice immunised with various human MUC-1 vaccines, *Cancer Immunol Immunother*, **48**: 588, 2000

Ahlert T, Sauerbrei W, Bastert G, Ruhland S, Bartik B, Simiantonaki N, Schumacher J, Hacker B, Schumacher M, Schirmacher V, Tumor cell number and viability as quality and efficacy parameters of autologous virus modified cancer vaccines, *J Clin Oncol*, **15**: 1354, 1997

Ahmed R, Gray D, Immunological memory and protective immunity: understanding their relation, *Science*, **272**: 54, 1996

Akagi J, Hodge J, McLaughlin J, Gritz L, Mazzara G, Kufe D, Schlom J, Kantor J, Therapeutic anti-tumour response after immunisation with an admixture of recombinant vaccinia viruses expressing a modified MUC-1 gene and the murine T-cell costimulatory molecule B7, *J Immunother*, **20**: 38, 1997

Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B, DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity, *J Exp Med*, **189**: 169, 1999

Apostolopoulos V, Loveland B, Pietersz G, McKenzie I, CTL in mice immunised with human mucin 1 are MHC-restricted, *J Immunol*, **155**: 5089, 1995

Apostolopoulos V, McKenzie I, Cellular mucins: targets for immunotherapy, *Crit Rev Immunol*, **14**: 293, 1994

Attal M, Harousseau J, Stoppa A, Sotto J, Fuzibet J, Rossi J, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R, A prospective, randomised trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome, *N Engl J Med*, **335**: 91, 1996

Ausubel M, Current protocols in molecular biology, 1st ed., *Greene Pub. Ass. and Wiley Interscience*, 1987

Bachmann M, Barner M, Viola A, Kopf M, Distinct kinetics of cytokine production and cytotoxicity in effector and memory T cells after viral infection, *Eur J Immunol*, **29**: 291, 1999a

Bachmann M, Gallimore A, Linkert S, Cerundolo V, Lanzavecchia A, Kopf M, Viola A, Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signalling in naïve and memory T cells, *J Exp Med*, **189**: 1521, 1999b

Badawi A, Badr M, Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ and levels of prostaglandin E₂ and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ in human breast cancer and metastasis, *Int J Cancer*, **103**: 84, 2003

Bagshawe, K, Springer C, Searle F, Antoniow P, Sharma S, Melton R, Sherwood R, A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites, *Brit J Cancer*, **58**: 700, 1988

Bai L, Beckhove P, Feuerer M, Umansky V, Choi C, Solomayer F, Diel I, Schirmacher V, Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bi-directional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo, *Int J Cancer*, **103**: 73, 2003

Bai L, Koopmann J, Fiola C, Fournier P, Schirmacher V, Dendritic cells pulsed with viral oncolysates potently stimulate autologous T cells from cancer patients, *Int J Oncol*, **21**: 685, 2002

Banchereau J, Palucka A, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski K, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinmann R, Fay J, Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine, *Cancer Res*, **61**: 6451, 2001

Bargmann C, Hung M, Weinberg R, The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein, *Nature*, **319**: 226, 1986

Barlogie B, Alexanian R, Therapy of primary resistant and relapsed multiple myeloma, *Onkologie*, **9**: 210, 1986

- Barnd D, Lan M, Metzgar R, Finn O, Specific major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumour-associated mucins by human cytotoxic T cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 7159, 1989
- Baron V, Bouneaud C, Cumano A, Lim A, Arstila, T, Kourilsky P, Ferradini L, Pannetier C, The repertoires of circulating human CD8 (+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct, *Immunity*, **18**: 193, 2003
- Basu S, Binder R, Suto R, Anderson K, Srivastava P, Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NK-kappa B pathway, *Int Immunol*, **12**: 1539, 2000
- Becker N, Wahrendorf J, Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990, *Springer Verlag Heidelberg*, 1997
- Beckhove P, Feuerer M, Dolenc M, Choi C, Sommerfeldt N, Schwendemann J, Ehlert K, Altevogt P, Schuetz F, Bastert G, Schirrmacher V, Umansky V, Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognise and reject xenotransplanted autologous tumors, *J Clin Invest*, in revision
- Beckhove P, Schütz F, Diehl I, Solomayer E, Bastert G, Förster J, Oberniedermayer M, Feuerer M, Bai L, Umansky V, Schirrmacher V, Efficient engraftment of human primary breast cancer transplants in nonconditioned NOD/Scid mice, *Int J Cancer*, **105**: 444, 2003
- Belli F, Testori A, Rivoltini L, Maio M, Andreola G, Sertoli M, Gallino G, Piris A, Cattelan A, Lazzari I, Carraba M, Scita G, Santantonio C, Pilla L, Tragni G, Lombardo C, Arienti F, Marchiano A, Queirolo P, Bertolini F, Cova A, Lamaj E, Ascani L, Camerini R, Corsi M, Cascinelli N, Lewis J, Srivastava P, Parmiani G, Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous tumor-derived heat shock protein gp96-peptide complexes: clinical and immunological findings, *J Clin Oncol*, **20**: 4169, 2002
- Ben-Efraim S, One hundred years of cancer immunotherapy: a critical appraisal, *Tumor Biol*, **20**: 1, 1999
- Berlin-Rufenach C, Lymphocyte migration in lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1) deficient mice, *J Exp Med*, **189**: 1467, 1999

- Blackman M, Woodland D, In vivo effects of superantigens, *Life Sciences*, **57**: 1717, 1995
- Bluestone J, Abbas A, Natural versus adaptive regulatory T cells, *Nat Rev Immunol*, **3**: 253, 2003
- Bogen B, Malissen B, Haas W, Idiotypic-specific T cell clones that recognise syngeneic immunoglobulin fragments in the context of class II molecules, *Eur J Immunol*, **16**: 1373, 1986
- Bohlen H, Kessler M, Sextro M, Diehl V, Tesch H, Poor clinical outcome of patients with Hodgkin's disease and elevated interleukin-10 serum levels. Clinical significance of interleukin-10 serum levels for Hodgkin's Disease, *Ann Hematol*, **79**: 110, 2000
- Boon T, van der Bruggen P, Human tumor antigens recognised by T lymphocytes, *J Exp Med*, **183**: 725, 1996
- Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, **72**: 248, 1976
- Braun M, Lahey E, Kelsall B, Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants, *J Immunol*, **164**: 3009, 2000
- Brinkmann U, Gallo M, Brinkmann E, Kunwar S, Pastan I, A recombinant immunotoxin that is active on prostate cancer cells and that is composed of the Fv region of monoclonal antibody PR1 and a truncated form of Pseudomonas exotoxin, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 547, 1993
- Brossart P, Heinrich K, Stuhler G, Behnke L, Reichardt V, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee H, Kanz L, Brugger W, Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC-1 tumour antigen for broadly applicable vaccine therapies, *Blood*, **93**: 4309, 1999
- Brossart P, Schneider A, Dill P, Schammann T, Grunebach F, Wirths S, Kanz L, Buhring H, Brugger W, The epithelial tumour antigen MUC-1 is expressed in hematological malignancies and is recognised by MUC-1 specific cytotoxic T lymphocytes, *Cancer Res*, **61**: 6846, 2001

- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt V, Kanz L, Brugger W, Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells, *Blood*, **96**: 3102, 2000
- Brown R, Yuen E, Nelson M, Gibson J, Joshua D, The prognostic significance of T cells receptor beta gene rearrangements and idiotype-reactive T cell in multiple myeloma, *Leukemia*, **11**: 1312, 1997
- Brugger W, Bühring H, Grünebach F, Vogel W, Kaul S, Müller R, Brümmendorf T, Ziegler B, Rappold I, Brossart P, Scheduling S, Kanz L, Expression of MUC-1 epitopes on normal bone marrow: implications for the detection of micrometastatic tumor cells, *J Clin Oncol*, **17**: 1535, 1999
- Bühring H, Sures I, Jallal B, Weiss F, Busch F, Ludwig W, Handgretinger R, Waller H, Ullrich A, The receptor tyrosine kinase p185HER2 is expressed on a subset of B-lymphoid blasts from patients with acute lymphoblastic leukaemia and chronic myelogenous leukaemia, *Blood*, **86**: 1916, 1995
- Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core protein epitopes of the MUC-1 gene product, *Epithel Cell Biol*, **2**: 155, 1993
- Butcher E, Williams M, Youngman K, Rott L, Briskin M, Lymphocyte trafficking and regional immunity, *Adv Immunol*, **72**: 209, 1999
- Coley W, Treatment of inoperable malignant tumours with the toxin of erysipelas and the *Bacillus prodigiosus*, *Trans Am Surg Assoc*, **12**: 183, 1894
- Coligan J, Current protocols in immunology, 1st ed., *Greene Pub. Ass. and Wiley Interscience*, 1991
- Coppola M, Blackman M, Bacterial superantigens reactivate antigen-specific CD8+ memory T cells, *Inter Immunol*, **9**: 1393, 1997
- Cormier J, Salgaller M, Prevette T, Barracchini K, Rivoltini L, Restifo N, Rosenberg S, Marincola F., Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunised with a peptide from MART-1/Melan A, *Cancer J Sci Am*, **3**: 37, 1997

Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palombo A, Van Lint M, Bacigalupo A, Santoro A, Musso M, Majolino I, Boccadoro M, Pileri A, Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells, *J Clin Oncol*, **17**: 208, 1999

Cortes J, Talpaz M, Cabanillas F, Seymour J, Kurzrock R, Serum levels of interleukin-10 in patients with diffuse large cell lymphoma : lack of correlation with prognosis, *Blood*, **85**: 2516, 1995

Coulie P, Somville M, Lehmann F, Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells, *Int J Cancer*, **50**: 289, 1992

Cremer F, Ehrbrecht E, Kiel K, Benner A, Hegenbart U, Ho A, Goldschmidt H, Moos M, Evaluation of the kinetics of the bone marrow tumor load in the course of sequential high-dose therapy assessed by quantitative PCR as a predictive parameter in patients with multiple myeloma, *Bone Marrow Transplant*, **26**: 851, 2000

Croft M, Bradley M, Swain S, Naïve versus memory CD4 T cell response to antigen: memory cells are less dependent of accessory cell costimulation and can respond to many antigen presenting cell types including resting B cells, *J Immunol*, **152**: 2675, 1994

Czerkinsky C, Andersson G, Ekre H, Nilsson L, Klareskog L, Ouchterlony O, Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. Enumeration of gamma-interferon secreting cells, *J Immunol Methods*, **110**: 29, 1988

Dazzi F, Capelli D, Hasserijian R, Cotter F, Cabo M, Poletti A, Chiswangwatanakul W, Goldman J, Gordon M, The kinetics and extent of engraftment of chronic myelogenous leukemia cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency mice reflect the phase of donor's disease: an in vivo model of chronic myelogenous leukemia biology, *Blood*, **92**: 1390, 1998

de Caestecker M, Piek E, Roberts A, Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer, *J Natl Cancer Inst*, **92**: 1388, 2000

Dhodakpar M, Krasovsky J, Olson K, T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 13009, 2002

Dhodakpar M, Geller M, Chang D, Shimizu K, Fujii S, Dhodakpar K, Krasovski J, A reversible defect in Natural Killer T cell function characterise the progression of premalignant to malignant multiple myeloma, *J Exp Med*, **197**: 1667, 2003a

Dhodakpar M, Krasovsky J, Osman K, Geller M, Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy, *J Exp Med*, **11**: 1753, 2003b

Diaz C, Schroit A, Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry, *J Membrane Biol*, **151**: 1, 1996

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold T, Berger T, Schuler G, Ex vivo isolation and characterisation of CD4+CD25+ T cells with regulatory properties from human blood, *J Exp Med*, **193**: 1303, 2001

Diefenbach A, Raulet D, The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity, *Immunol Rev*, **188**: 9, 2002

Disis M, Knutson K, Schiffman K, Rinn K, McNeel D, Pre-existent immunity to the HER-27neu overexpressing breast and ovarian cancer, *Breast Cancer Res Treat*, **62**: 245, 2000

Disis M, Schiffman K, Cancer vaccines targeting the Her2/neu oncogeneic protein, *Semin Oncol*, **28**: 12, 2001

Domenech N, Henderson R, Finn O, Identification of an HLA-11-restricted epitope from the tandem-repeat domain of the epithelial tumour antigen mucin, *J Immunol*, **155**: 4766, 1995

Dooper M, Wassink L, M'Rabet L, Graus Y, The modulatory effects of prostaglandin-E on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells are independent of the prostaglandin subtype, *Immunol*, **107**: 152, 2002

Dunbar P, Smith C, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, Smith C, Chao D, Salio M, Shepherd D, Mirza F, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Evans A, Russell-Jones R, Harris A, Cerundolo V, A shift in the phenotype of melan-A-specific CTL identifies

melanoma patients with an active tumor-specific immune response, *J Immunol*, **165**: 6644, 2000

Dunne P, Faint J, Gudgeon N, Fletcher J, Plunkett F, Soares M, Hislop A, Annels N, Rickinson A, Salmon M, Akbar A, Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential, *Blood*, **100**: 933, 2002

Dupperay C, Klein B, Durie B, Zhang X, Jourdan M, Poncelet P, Favier F, Vincent C, Brochier J, Lenoir G, Phenotypic analysis of human myeloma cell lines, *Blood*, **73** : 566, 1989

Enk A, Jonuleit H, Saloga J, Knop J, Dendritic cell as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma, *Int J Cancer*, **73**: 309, 1997

Fadok V, Voelker D, Campbell P, Cohen J, Bratton D, Henson P, Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages, *J Immunol*, **148**: 2207, 1992

Feurerer M, Beckhove P, Bai L, Solomayer E, Bastert G, Diel I, Schirrmacher V, Enrichment of memory TC and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients, *Int J Cancer*, **92**: 96, 2001a

Feurerer M, Beckhove P, Bai L, Solomayer E, Bastert G, Diel I, Pedain C, Oberniedermayr M, Schirrmacher V, Umansky V, Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow, *Nature Med*, **7**: 452, 2001b

Feurerer M, Beckhove P, Garbi N, Mahnke Y, Limmer A, Hommel M, Hämmerling G, Kyewski B, Hamann A, Umansky V, Schirrmacher V, Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen, *Nat Med*, **9**:1151, 2003

Finn O, Jerome K, Henderson R, Pecher G, Domenech N, Magarian-Blander J, Barrat-Boyes S, MUC-1 epithelial tumour mucin-based immunity and cancer vaccines, *Immunol Rev*, **154**: 61, 1995

Fishman P, Merimski O, Baharav E, Shoenfeld Y, Autoantibodies to tyrosinase: the bridge between melanoma and vitiligo, *Cancer (Phila.)*, **79**: 1461, 1997

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M, CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs, *Cell*, **99**: 23, 1999

Fournier P, Zeng J, Schirmacher V, Two ways to induce innate immune responses in human PBMCs: paracrine stimulation of IFN- γ responses by viral protein or dsRNA, *Int J Oncol*, **23**: 673, 2003

Fung P, Longenecker, B.M., Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin like glycoprotein secreted by a mammary adenocarcinoma (TA3-HA), *Cancer Res*, **51**: 1170, 1991

Fujisawa N, Sakao Y, Hayashi S, Hadden W, 3rd, Harmon, C.L., Miller, E.J., alpha-chemokine growth factors for adenocarcinomas; a synthetic peptide inhibitor for alpha-chemokines inhibits the growth of adenocarcinoma cell lines, *J Cancer Res Clin Oncol*, **126**: 19, 2000

Gallucci S, Matzinger P, Danger signal: SOS to the immune system, *Curr Opin Immunol*, **13**: 114, 2001

Ganpule G, Knorr R, Miller J, Carron C, Dustin M, Low affinity of cell surface lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) generates selectivity for cell-cell interactions, *J Immunol*, **159**: 2685, 1997

Gao F, Khammanivong V, Liu W, Legatt G, Frazer I, Fernando G, Antigen-specific CD4+ T cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell, *Cancer Res*, **62**: 6438, 2002

Geginat J, Sallusto F, Lanzavecchia A, Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naïve, central memory, and effector memory CD4+ T cells, *J Exp Med*, **194**: 1711, 2001

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F, Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines, *Blood*, **101**: 4260, 2003

Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell J, A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats, *J Biol Chem*, **263**: 12820, 1988

Girling A, Bartkova J, Burchell J, Gendler S, Gillet C, Taylor-Papadimitriou J, A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas, *Int J Cancer*, **43**: 1072, 1989

Goldrath A, Bevan M, Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire, *Nature*, **402**: 255, 1999

Goldschmidt H, Hegenbart U, Wallmeier M, Moos M, Haas R, High-dose chemotherapy in multiple myeloma, *Leukemia*, **11 Suppl 5**: S27, 1997

Gorelik L, Flavell R, Transforming growth factor- β in T-cell biology, *Nat Rev Immunol*, **2**: 46, 2002

Goshorn S, Svensson H, Kerr D, Somerville J, Senter P, Fell H, Genetic construction, expression and characterisation of a single-chain anti-carcinoma antibody fused to β -lactamase, *Cancer Res*, **53**: 2123, 1993

Gray D, A role for antigen in the maintenance of immunological memory, *Nat Rev Immunol*, **2**: 60, 2002

Harris S, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R, Prostaglandins as modulators of immunity, *Trends Immunol*, **23**: 144, 2002

Helgason C, Kalberger C, Damen J, Chappel S, Pineault N, Krystal G, Humphries R, A dual role for Src homology 2 domain-containing inositol-5 phosphatase (SHIP) in immunity: aberrant development and enhanced function of B lymphocytes in ship^{-/-} mice, *J Exp Med*, **191**: 781, 2000

Houi K, Kobayashi T, Kato S, Moccio S, Inoue K, Increased plasma TGF- β 1 in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Acta Neurol Scand*, **106**: 299, 2002

Hsu F, Benike C, Fagnoni F, Liles T, Czerwinski D, Taidi B, Engleman E, Levy R, Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells, *Nat Med*, **2**: 52, 1996

Hsu F, Caspar C, Czerwinski D, Kwak L, Liles T, Syrengelas A, Taidi-Laskowski B, Levy R, Tumour-specific idiotypic vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma – long term results of a clinical trial, *Blood*, **89**: 3129, 1997

Hu H, Huston G, Duso D, Lepak N, Roman E, Swain S, CD4+ T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division, *Nat Immunol*, **2**: 705, 2001

Huang F, Platt N, Wykes M, Major J, Powell T, Jenkins C, MacPherson G, A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes, *J Exp Med*, **191**: 435, 2000

Huppa J, Davis M, T-cell antigen recognition and the immunological synapse, *Nat Rev Immunol*, **3**: 973, 2003

Ibelgaufts H, Dictionary of cytokines, *VHC Verlagsgesellschaft mbH*, Weinheim, Deutschland, 1995

Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A, The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells, *Immunity*, **8**: 89, 1998

Igney F, Krammer P, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat Rev Cancer*, **2**: 277, 2002

Ivanovic V, Todorovic-Rakovic N, Demajo M, Neskovic-Konstantinovic Z, Subota V, Ivanisevic-Milovanovic O, Nikolic-Vukosavljevic D, Elevated plasma levels of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in patients with advanced breast cancer, association with disease progression, *Eur J Cancer*, **39**: 454, 2003

Jager E, Stockert E, Zidianakis Z, Chen Y, Karbach J, Jager D, Arand M, Ritter G, Old L, Knuth A, Humoral immune response of cancer patients against “cancer-testis” antigen NY-ESO-1: correlation with clinical events, *Int J Cancer*, **84**: 506, 1999

Jameson S, Maintaining the norm: T-cell homeostasis, *Nature Rev Immunol*, **2**: 547, 2002

Janeway jr. C, Travers P, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg, Zweite Auflage, 2001

Janeway jr C, Sakator N, Eisen H, Recognition of immunoglobulin idiotypes by thymus-derived lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci USA*, **72**: 2357, 1975

Janson C, Grunewald J, Österborg A, DerSimonian H, Brenner M, Mellstedt H, Wigzell H, Predominant T cell receptor V gene usage in patients with abnormal clones of B cells, *Blood*, **77**: 1776, 1991

Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk A, Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells, *Trends Immunol*, **22**: 394, 2001

Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G-I, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer E, Littman D, Lang R, In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens, *Immunity*, **17**: 211, 2002

Kabayashi H, Terao T, Kawashima Y, Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, *J Clin Oncol*, **10**: 95, 1992

Kaech S, Ahmed R, Memory CD8⁺ T-cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells, *Nat Immunol*, **2**: 415, 2001

Kaech S, Wherry J, Ahmed R, Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development, *Nat Rev Immunol*, **2**: 251, 2002

Kaliński P, Hilkens C, Wierenga E, Kapsenberg M, T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal, *Immunol Today*, **20**: 561, 1999

Karanikas V, Hwang L, Pearson J, Ong C, Apostopoulos V, Vaughan H, Xing P, Jamieson G, Pietersz G, Tait B, Broadbent R, Thynne G, McKenzie I, Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunised with mannan-MUC-1 fusion protein, *J Clin Invest*, **100**: 2783, 1997

- Kay N, Leong T, Kyle R, Greipp P, Van Ness B, Bone N, Oken M, Altered T cell repertoire usage in CD4 and CD8 subsets of multiple myeloma patients, a study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E9487), *Leukem Lymphoma*, **33**: 127, 1999
- Kim J, Modlin R, Moy R, Dubinett S, McHugh T, Nickoloff B, Uyemura K, IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response, *J Immunol*, **155**: 2240, 1995
- Knabbe C, Kopp A, Hilgers W, Lang D, Muller V, Zugmaier G, Jonat W, Regulation and role of TGF-beta production in breast cancer, *Ann NY Acad Sci*, **784**: 263, 1996
- Knutson K, Schiffman K, Disis, M, Immunization with a Her-2/neu helper peptide vaccine generates Her-e/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients, *J Clin Invest*, **107**: 477, 2001
- Kong F, Anscher M, Murase T, Abbott B, Iglehart J, Jirtle R, Elevated plasma transforming growth factor- β 1 levels in breast cancer patients decrease after surgical removal of the tumor, *Ann Surg*, **222**: 155, 1995
- Kong F, Jirtle R, Huang D, Clough R, Anscher M, Plasma transforming growth factor-beta1 level before radiotherapy correlates with long term outcome of patients with lung carcinoma, *Cancer*, **86**: 1712, 1999
- Kong, F.M., Washington, M.K., Jirtle R, Anscher M, Plasma transforming growth factor-beta 1 reflects disease status in patients with lung cancer after radiotherapy: a possible tumor marker, *Lung Cancer*, **16**: 47-59, 1996
- Koni P, Joshi S, Temann U, Olson D, Burkly L, Flavell R, Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow, *J Exp Med*, **193**: 741, 2001
- Kontani K, Taguchi O, Marita T, Hiraiwa N, Sawai S, Hanaoka J, Ichinose M, Tezuka N, Inoue S, Fujino S, Kannagi R, Autologous dendritic cells or cells expressing both B7-1 and MUC-1 can rescue tumour-specific cytotoxic T lymphocytes from MUC-1 mediated apoptotic cell death, *J Leukocyte Biol*, **68**: 225, 2000
- Kotzin B, Leung D, Kappler J, Marrack P, Superantigens and their potential role in human disease, *Adv Immunol*, **54**: 99, 1993

Krasagakis K, Garbe C, Schrier P, Orfanos C, Paracrine and autocrine regulation of human melanocyte and melanoma cell growth by transforming growth factor beta in vitro, *Anticancer Res*, **14**: 2565, 1994

Kuehl M, Bergsagel L, Multiple Myeloma: evolving genetic events and host interactions, *Nat Rev Cancer*, **2**: 175, 2002

Lanzavecchia A, Mechanisms of antigen uptake for presentation, *Curr Opin Immunol*, **8**: 348, 1996

Lanzavecchia A, Sallusto F, Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors and memory cells, *Science*, **290**: 92, 2000a

Lanzavecchia A, Sallusto F, From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation, *Curr Opin Immunol*, **12**: 92, 2000b

Lanzavecchia A, Sallusto F, The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics, *Curr Opin Immunol*, **13**: 291, 2001

Lanzavecchia A, Sallusto F, Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response, *Nat Rev Immunol*, **2**: 982, 2002

Lathe R, Kieny M, Demotte N, Vantomme V, Stroobant V, Traversari C, Identification of five MAGE-A1 epitopes recognised by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1, *J Immunol*, **163**: 2928, 1999

Lau L, Jamieson B, Somasundaram R, Ahmed R, Cytotoxic T cell memory without antigen, *Nature*, **369**: 648, 1994

Lauritzsen G, Weiss S, Dembic Z, Bogen B, Naive idiotype-specific CD4⁺ T cells and immunosurveillance of B-cell tumours. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 5700, 1994

Lauw F, Simpson A, Prins J, Smith M, Kurimoto M, van Deventer S, Speelman P, Chaowagul W, White N, van der Poll T, Elevated plasma concentrations of interferon (IFN)- γ and the IFN- γ -inducing cytokines interleukin (IL)-18, IL-12, and IL-15 in severe melioidosis, *J Infect Diseases*, **180**: 1878, 1999

Letsch A, Keilholz U, Assfalg G, Mailänder V, Thiel E, Scheibenbogen C, Bone marrow contains melanoma-reactive CD8⁺ effector T cells and compared with peripheral blood enriched numbers of melanoma-reactive CD8⁺ memory T cells, *Cancer Res*, **17**: 5582, 2003

Liew F, TH1 and TH2: a historical perspective, *Nat Rev Immunol*, **2**: 55, 2002

Liu Y-J, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M, Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation, *Nat Immunol*, **2**: 585, 2001

Liyanage U, Moore T, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin J, Strasberg S, Eberlein T, Goedegebuure P, Linehan D, Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma, *J Immunol*, **169**: 2756, 2002

Lloyd K, Burchell J, Kudryashov V, Yin B, Taylor-Papadimitriou J, Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines, *J Biol Chem*, **271**: 33325, 1996

London C, Lodge M, Abbas A, Functional responses and costimulator dependence of memory CD4 T cells, *J Immunol*, **164**: 265, 2000

Lozzio C, Lozzio B, Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome, *Blood*, **45**: 321, 1975

Lozzio B, Lozzio C, Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukaemia cell line, *Leuk Res*, **3**: 363, 1979

Lúdvíksson B, Seegers D, Resnik A, Strober W, The effect of TGF- β 1 on immune responses of naïve versus memory CD4⁺ TH1/TH2 T cells, *Eur J Immunol*, **30**: 2101, 2000

Mahnke Y, Schirmacher V, A novel tumour model system for the study of long-term protective immunity and immune T cell memory, *Cell Immunol*, **221**: 89, 2003

Manjunath N, Shankar P, Wan J, Weninger W, Crowley M, Hieshima K, Springer T, Fan X, Shen H, Lieberman J, von Adrian U, Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes, *J Clin Invest*, **108**: 871, 2001

Marincola F, Jaffee E, Hicklin D, Ferrone S, Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance, *Adv Immunol*, **74**: 181, 2000

Mark A, Mangkornkanok M, B-cell lymphoma marking only with anti-epithelial membrane antigen, *Cancer (Phila.)*, **63**: 2152, 1989

Martin S, Reutelingsperger C, McGahon A, Rader J, van Schie R, LaFace D, Green D, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus. Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J Exp Med*, **182**: 1545, 1995

Marshall D, Turner S, Belz G, Wingo S, Andreansky S, Sangster M, Riberdy J, Liu T, Tan M, Doherty P, Measuring the diaspora for virus-specific CD8⁺ T cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 6313, 2001

Marumo T, Schini-Kerth V, Busse R, Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor- κ B and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells, *Diabetes*, **48**: 1131, 1999

Masopust D, Vezys V, Marzo A, Lefrancois L, Preferential localisation of effector and memory cells in nonlymphoid tissue, *Science*, **291**: 2413, 2001

Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, Tanaka S, Goto M, Irimura T, Kim Y, Sato E, Yonezawa S, Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma, *Histopathology*, **42**: 26, 2003

Matzinger P, An innate sense of danger, *Semin Immunol*, **10**: 399, 1998

McNeel D, Nguyen L, Ellis W, Higano C, Lange P, Disis M, Naturally occurring prostate cancer antigen-specific T cell responses of a TH1 phenotype can be detected in patients with prostate cancer, *Prostate*, **47**: 222, 2001

Medawar P, Tolerance reconsidered: a critical survey, *Transplant Proc*, **5**: 7, 1973

Medema J, Schuurhuis, D, Rea D, van Tongeren J, de Jong J, Bres S, Laban S, Toes R, Toebes M, Schumacher T, Bladergroen B, Ossendorp F, Kummer J, Melief C, Offringa R, Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type-1 and type-2 cells, *J Exp Med*, **194**: 657, 2001

Medzhitov R, Janeway jr C, Innate immune recognition and control of adaptive immune responses, *Semin Immunol*, **10**: 351, 1998

Medzhitov R, Janeway jr C, Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system, *Science*, 296, 298, 2002

Michie C, McLean A, Alcock C, Beverley P, Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms, *Nature*, **360**: 264, 1992

Mihm M, Clemente C, Cascinelli N, Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response, *Lab Invest*, **74**: 43, 1996

Mire-Sluis A, Thorpe R, Cytokines, *Academic Press*, London, UK, 1998

Moasser M, Basso A, Averbuch S, Rosen N, The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signalling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells, *Cancer Res*, **61**: 7184, 2001

Mocellin S, Wang E, Marincola F, Cytokines and Immune response in the tumor microenvironment, *J Immunother*, **24**: 392, 2001a

Mocellin S, Ohnmacht G, Wang E, Marincola F, Kinetics of cytokine expression in melanoma metastases classifies immune responsiveness, *Int J Cancer*, **93**: 236, 2001b

Mocellin S, Panelli M, Wang E, Nagorsen D, Marincola F, The dual role of IL-10, *Trends Immunol*, **24**: 36, 2003

Moehler T, Neben K, Benner A, Egerer G, Krasniqi F, Ho A, Goldschmidt H, Salvage therapy for multiple myeloma with thalidomide and CED chemotherapy, *Blood*, **98**: 3846, 2001

Moldrem J, Lee P, Wang C, Felio K, Kantarjian H, Champlin R, Davis M, Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia, *Nat Med*, **6**: 1018, 2000

Monsurro V, Nagorsen D, Wang E, Provenzano M, Dudley M, Rosenberg S, Marincola F, Functional heterogeneity of vaccine-induced CD8+ T cells, *J Immunol*, **168**: 5933, 2002

Morton D, Hunt K, Bauer R, Lee J, Immunotherapy by active immunisation of the host using non-specific agent, In: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., eds., *The Biologic Therapy of Cancer*, Lippincott, Philadelphia, 627, 1991

Moss P, Gillespie G, Frodsham P, Bell J, Reyburn H, Clonal populations of CD4+ and CD8+ T cells in patients with multiple myeloma and paraproteinemia, *Blood*, **87**: 3297, 1996

Mukherji B, Chakraborty N, Sivanandham M, T-cell clones that react against autologous human tumors, *Immunol Rev*, **116**: 33, 1990

Mullbacher A, The long-term maintenance of cytotoxic T cell memory does not require persistence of antigen, *J Exp Med*, **179**: 317, 1994

Mullins D, Sheasley S, Ream R, Bullock T, Fu Y-X, Engelhard V, Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control, *J Exp Med*, **198**: 1023, 2003

Murali-Krishna K, Lau L, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R, Persistence of memory CD8 T cells in MHC class-I deficient mice, *Science*, **286**: 1377, 1999

Nagorsen D, Scheibenbogen C, Marincola F, Letsch A, Keilholz U, Natural T cell immunity against cancer, *Clin Cancer Res*, **9**: 4296, 2003

- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenij K, Nagura H, Ohtani H, CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer, *Cancer Res*, **58**: 3491, 1998
- Nelson H, Targeted cellular immunotherapy with bifunctional antibodies, *Cancer Cells*, **3**: 163, 1991
- Nelson E, Li X, Hsu F, Kwak L, Levy R, Clayberger C, Kresnky A, Tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype-vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma, *Blood*, **88**: 580, 1996
- Nestle F, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D, Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nat Med*, **4**: 328, 1998
- Nilsson K, Bennich H, Johansson S, Ponten J, Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient, *Clin Exp Immunol*, **7**: 477, 1970
- Nilsson K, Sundstrom C, Establishment and characteristics of two unique cell lines from patients with lymphosarcoma, *Int J Cancer*, **13**: 808, 1974
- Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y, Hayashi T, Hinoda Y, Imai K, Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognise an underglycosylated form of MUC1 mucin, *Int Immunol*, **9**: 791, 1997
- Ohtomo T, Sugamata Y, Ozaki Y, Ono K, Yoshimura Y, Kawai S, Koishihara Y, Ozaki S, Kosaka M, Hirano T, Tsuchiya M, Molecular cloning and characterisation of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, **258**: 583, 1999
- Old L, Chen Y-T, New paths in human cancer serology, *J Exp Med*, **187**: 1163, 1998
- Opfermann J, Ober B, Ashton-Rickardt P, Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes, *Science*, **283**: 1745, 1999

Panelli M, Riker A, Kammula U, Wang E, Lee K, Rosenberg, S, Marincola F, Expansion of tumor-T cell pairs from fine needle aspirates of melanoma metastases, *J Immunol*, **164**: 495, 2000

Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola F, Anichini A, Cancer immunotherapy with peptid-based vaccines: what have we achieved ? Where are we going ? *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*, **94**: 805, 2002

Paul W, Fundamental Immunology, 5th edition, *Lipincott William & Wilkins*, 2003

Pellat-Deceunynck C, Mellerin M, Labarriere N, Jegou G, Moreau-Aubry A, Harousseau J, Jotereau F, Bataille R, The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells, *Eur J Immunol*, **30**: 803, 2000

Pérez-Díez A, Marincola F, Immunotherapy against antigenic tumors : a game with a lot of players, *Cell Mol Life Sci*, **59** : 230, 2002

Petersson, M., Charo, J., Salazar-Onfray, F., Charo J, Salazar-Onfray F, Noffz G, Mohaupt M, Qin Z, Klein G, Blankenstein T, Kiessling R, Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1, *J Immunol*, **161**: 2099-2105, 1998

Pieters J, MHC class II restricted antigen presentation, *Curr Op Immunol*, **9**: 89, 1997

Pisetsky D, Immune activation by bacterial DNA: a new genetic code, *Immunity*, **5**: 303, 1996

Pittet M, Valmori D, Dunbar P, Speiser D, Lienard D, Lejeune F, Fleischhauer K, Cerundolo V, Cerottini J, Romero P, High frequencies of naïve Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals, *J Exp Med*, **190**: 705, 1999

Plunkett T, Correa I, Miles D, Taylor-Papadimitriou J, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **6**: 467, 2001

- Pockaj B, Sherry R, Wie J, Yannelli J, Carter C, Leitman S, Carasquillo J, Steinberg S, Rosenberg S, Yang J, Localisation of ¹¹¹indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor patients receiving adoptive immunotherapy: augmentation with cyclophosphamide and correlation with response, *Cancer*, **73**: 1731, 1994
- Pomer S, Thiele R, Staehler G, Drehmer I, Lohrke H, Schirmacher V, Tumor vaccination in renal cell carcinoma with and without interleukin-2 (IL-2) as adjuvant. A clinical contribution to the development of effective active specific immunization, *Urologe A*, **34**: 215, 1995
- Power L, Popplewell E, Holloway J, Diaper N, Warner J, Jones C, Immunoregulatory molecules during pregnancy and at birth, *J Reprod Immunol*, **56**: 19, 2002
- Prehn R, Main J, Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas, *J Natl Cancer Inst*, **18**: 769, 1957
- Press M, Cordon-Cardo C, Slamon D, Expression of the Her-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues, *Oncogene*, **5**: 953, 1990
- Pupa S, Menard S, Andreola S, Colnaghi M, Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients, *Cancer Res*, **53**: 5864, 1993
- Raitakari M, Brown R, Sze D, Yuen E, Barrow L, Nelson M, Pope B, Esdale W, Gibson J, Joshua D, T cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells, *Br J Haematol*, **110**: 203, 2000
- Reinhardt R, Khoruts A, Merica R, Zell T, Jenkins M, Visualising the generation of memory CD4 T cells in the whole body, *Nature*, **410**: 101, 2001
- Reinhardt R, Bullard D, Weaver C, Jenkins M, Preferential accumulation of antigen-specific effector CD4 T cells at an antigen injection site involves CD62E-dependent migration but not local proliferation, *J Exp Med*, **197**: 751, 2003
- Renkvist N, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, A listing of human tumor antigens recognised by T cells, *Cancer Immunol Immunother*, **50**: 3, 2001

Riker A, Panelli M, Kammula U, Wang E, Wunderlich J, Abati A, Fetsch P, Rosenberg S, Marincola F, Development and characterisation of melanoma cell lines established by fine-needle aspiration biopsy: advances in the monitoring of patients with metastatic melanoma, *Cancer Detect Prev*, **23**: 387, 1999

Rosenberg S, Development of cancer immunotherapies based on identification of the genes encoding cancer regression antigens, *J Natl Cancer Inst*, **88**: 1635, 1996

Rosenberg S, Progress in human tumour immunology and immunotherapy, *Nature*, **411**: 380, 2001

Roth P, Mikulka W, Smith C, Bolton W, Zhang C, Schlossman S, A novel marker for the measurement of apoptotic cells, Cytometry, Abstract # CC17 XVIII, *ISAC*, **Sup.8**, 44, 1996

Salazar-Onfray F, Petersson M, Franksson L, Matsuda M, Blankenstein T, Karre K, Kiessling R, IL-10 converts mouse lymphoma cells to a CTL resistant, NK-sensitive phenotype with low but peptide-inducible MHC class I expression, *J Immunol*, **154**: 6291, 1995

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A, Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature*, **401**: 708, 1999

Salter R, Howell D, Cresswell P, Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids, *Immunogenetics*, **21**: 235, 1985

Salzillo F, Radioimmunosintigraphy with 99mTc-225.28S-F(ab') in cutaneous and ocular melanomas: case of particular clinical interest, *J Nucl Biol Med*, **37**: 191, 1993

Samuel J, Budzynski W, Reddish M, Ding L, Zimmermann G, Krantz M, Koganty R, Longenecker B, Immunogenicity and anti-tumour activity of a liposomal MUC-1 peptide-based vaccine, *Int J Cancer*, **75**: 295, 1998

Satterwhite D, Moses H, Mechanisms of transforming growth factor-beta 1-induced cell cycle arrest, *Invasion Metastasis*, **14**: 309, 1994

Sauter B, Albert M, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N, Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not to primary tissue cells or apoptotic

cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells, *J Exp Med*, **191**: 423, 2000

Sawyers C, Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets, *Curr Opin Genet Dev*, **12**: 111, 2002

Schechter A, Stem D, Vaidyanathan L, The neu oncogene: An erbB related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen, *Nature*, **312**: 513, 1984

Schirmacher V, Anti-tumor immune memory and its activation for control of residual tumor cells and improvement of patient survival, *Virus Therapy of Human Cancers* (Sinkovics, J., Horvath, J., eds), Marcel Decker (in press)

Schirmacher V, Ahlert T, Pröbstle T, Steiner H, Herold-Mende C, Gerhards R, Hagmüller E, Immunisation with virus-modified tumor cells, *Semin Oncol*, **25**: 677, 1998

Schirmacher V, Feuerer M, Beckhove P, Ahlert V, Umansky V, T cell memory, anergy and immunotherapy in breast cancer, *J Mammary Gland Biol Neopl*, **7**: 201, 2002

Schirmacher V, Haas C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R, Ertel C, Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle Disease Virus, *Gene Ther*, **6**: 63, 1999

Schirmacher V, Feuerer M, Fournier P, Ahlert T, Umansky V, Beckhove P, T-cell priming in bone marrow: the potential for long-lasting protective anti-tumor immunity, *Trends Mol Med*, **9**: 526, 2003

Schluns K, Williams K, Ma A, Zheng XX, Lefrançois L, Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells, *J Immunol*, **168**: 4827, 2002

Schluns K, Lefrançois L, Cytokine control of memory T-cell development and survival, *Nat Rev Immunol*, **3**: 269, 2003

Schmittl A, Keilholz U, Scheibenbogen C, Evaluation of the interferon- γ ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood, *J Immunol Methods*, **210**: 167, 1997

Schultz L, Schweitzer P, Christianson S, Gott B, Schweitzer I, Tenent B, McKenna S, Mobraaten L, Rajan T, Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice, *J Immunol*, **154**: 180, 1995

Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag P, Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas, *Cancer Res*, **61**: 3932, 2001

Schwendemann J, Choi C, Schirmacher V, Beckhove P, Dynamics of T-cell memory through activation induced cycles of proliferation and effector function according to chemokine receptor 7 expression, submitted

Shim K, Kim K, Han W, Park E, Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection, *Cancer*, **85**: 554, 1999

Shirai Y, Kawata S, Tamura S, Ito N, Tsushima H, Takaishi K, Kiso S, Matsuzawa Y, *Cancer*, **73**: 2275, 1994

Shortman K, Liu Y-J, Mouse and human dendritic cell subtypes, *Nat Rev Immunol*, **2**: 151, 2002

Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D, Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen, *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 2320, 1988

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B, Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma, *N Engl J Med*, **341**: 1565, 1999

Slamon D, Development of the anti-HER2 monoclonal antibody Herceptin. Proceedings of the HER-2 state-of-the-art conference (educational lecture), Montreaux, Switzerland, 1999
Slamon D, Use of the anti HER-2/neu antibody Herceptin. Proceedings of the 10th International Congress on Anti-cancer Treatment Paris, France, 2000

Slamon D, Godolphin W, Jones L, Holt J, Wong S, Keith D, Levin W, Stuart S, Udove J, Ullrich A, Studies of the Her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science (Wash. DC)*, **244**: 707, 1989

Smyth M, Godfrey D, Trapani J, A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy, *Nat Immunol*, **2**: 293, 2001

Soares M, Mehta V, Finn O, Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC-1 transgenic mice with different potential for tumor rejection, *J Immunol*, **166**: 6555, 2001

Soule H, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *J Natl Cancer Inst*, **51**: 1409, 1973

Stockinger B, T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms, *Adv Immunol*, **71**: 229, 1999

Suresh M, Whitmire J, Harrington L, Larsen C, Pearson T, Altman J, Ahmed R, Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory, *J Immunol*, **167**: 5565, 2001

Swain S, Hu H, Huston G, Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors, *Science*, **286**: 1381, 1999

Sze D, Giesajtis G, Brown R, Raitakari M, Gibson J, Ho J, Baxter A, Fazekas de St Groth B, Basten A, Joshua D, Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8+CD57+CD28- compartment, *Blood*, **98**: 2817, 2001

Tang B, Vu M, Booker T, Santner S, Miller F, Anver M, Wakefield L, *J Clin Invest*, **112**: 1116, 2003

Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y, Kakiuchi H, Nakagawa N, Imai K, Yachi A, Expression of MUC-1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC-1 from a multiple myeloma patient, *J Immunol*, **153**: 2102, 1994

Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Plunkett T, Graham R, Correa I, Miles D, Smith M, MUC1 and the immunobiology of cancer, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **7**: 209, 2002

Termeer C, Schirmacher V, Brocker E, Becker J, Newcastle Disease Virus infection induces a B7-1/B7-2 independent T-cell-costimulatory activity in human melanoma cells, *Cancer Gene Ther*, **7**: 316, 2000

Thomson A, The cytokine handbook, 3rd ed. London, *Academic Press*, 1998

Titzer S, Christensen O, Manzke O, Tesch H, Wolf J, Emmerich B, Carsten C, Diehl V, Bohlen H, Vaccination of multiple myeloma patients with idiotypic-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects, *Br J Haematol*, **108**: 805, 2000

Trinchieri G, Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity, *Nat Rev Immunol*, **3**: 133, 2003

Trojan A, Schultze J, Witzens M, Vonderheide R, Ladetto M, Donovan J, Gribben J, Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies, *Nat Med*, **6**: 667, 2000

Tsushima H, Kawata S, High levels of transforming growth factor beta 1 in patients with colorectal cancer: association with disease progression, *Gastroenterology*, **110**: 375, 1996

Tuma R, Palmer E, Homeostasis of naïve, effector and memory CD8 T cells, *Curr Opin Immunol*, **14**: 348, 2002

Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K, Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer, *Clin Cancer Res*, **6**: 3282, 2000

Unsoeld H, Krautwald S, Voehringer D, Kunzendorf U, Pircher H, Cutting edge: CCR7+ and CCR7- memory T cells do not differ in immediate effector cell function, *J Immunol*, **169**: 638, 2002

van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, Andre M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli G, Bakkus M, Thielemans K, Boon T, Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells, *Blood*, **94**: 1156, 1999

- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., van den Eynde, B., Knuth, A., Boon, T., A gene encoding an antigen recognised by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma, *Science (Wash. DC)*, **254**: 1643-1647, 1991
- Veiga-Fernandes H, Walter U, Bourgeois C, McLean A, Rocha B, Response of naive and memory CD8 T cells to antigen stimulation in vivo, *Nat Immunol*, **1**: 47, 2000
- Vella AT, Dow S, Potter T, Kappler J, Marrack P, Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 3810, 1998
- Verhoeven B, Schlegel R, Williamson P, Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes, *J Exp Med*, **182**: 1597, 1995
- Vicari A, Caux C, Trinchieri G, Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation, *Sem Cancer Biol*, **12**: 33, 2002
- Villegas E, Elloso M, Reichmann G, Peach R, Hunter C, Role of CD28 in the generation of effector and memory responses required for resistance to toxoplasma gondii, *J Immunol*, **163**: 3344, 1999
- Visonneau S, Cesano A, Torosian M, Miller E, Santoli D, Growth characteristics and metastatic properties of human breast cancer xenografts in immunodeficient mice, *Am J Pathol*, **152**: 1299, 1998
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *J Clin Invest*, **108**: 341, 2001
- Von Hoegen P, Zawatzky R, Schirmacher V, Modification of tumor cells by a low dose of Newcastle Disease Virus: III. Potentiation of tumor specific cytolytic T cell activity via induction of interferon, $\alpha\beta$, *Cell Immunol*, **126**: 80, 1990
- Von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten A, Kenemans P, Snijdwint F, Kok A, van Kamp G, Paul M, van Diest P, Meijer S, Hilgers J, Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin, *J Clin Oncol*, **18**: 574, 2000

Wakefield L, Letterio J, Chen T, Danielpour D, Allison R, Pai L, Denicoff A, Noone M, Cowan K, O'Shaughnessy J, et al., Transforming growth factor-beta1 circulates in normal human plasma and is unchanged in advanced metastatic breast cancer, *Clin Cancer Res*, **1**: 129, 1995

Waldrop S, Davis K, Maino V, Picker L, Normal human CD4 memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis, *J Immunol*, **161**: 5284, 1998

Wang R, Human tumor antigens: implications for cancer vaccine development, *J Mol Med*, **77**: 640, 1999

Wang E, Marincola F, A natural history of melanoma: serial gene expression analysis, *Immunol Today*, **21**: 619, 2000

Wang E, Miller L, Ohnmacht G, Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness, *Cancer Res*, **62**: 3581, 2002

Wang S, Hung M, HER2 overexpression and cancer targeting, *Semin Oncol*, **28**: 115, 2001

Wang X, Stepp S, Brehm M, Chen H, Selin L, Welsh R, Virus-specific CD8 T cells in peripheral tissues are more resistant to apoptosis than those in lymphoid organs, *Immunity*, **18**: 631, 2003

Washburn B, Schirmacher V, Human tumor cell infection by Newcastle Disease Virus leads to upregulation of HLA and cell adhesion molecules and to induction of interferons, chemokines and finally apoptosis, *Int J Oncol*, **21**: 85, 2002

Wei M, Cresswell P, HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides, *Nature*, **356**: 443, 1992

Weir D, The handbook of experimental immunology, Vol. 1, 5th ed., Oxford, *Blackwell Scientific Publications*, 1996

- Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt E, Casper R, Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD/Scid mouse, *Biol Reprod*, **60**: 1462, 1999
- Wen Y, Barlogie B, Yi Q, Idiotype-specific cytotoxic T-lymphocytes in multiple myeloma : Evidence for their capacity to lyse autologous primary tumour cells, *Blood*, **97**: 1750, 2001
- Wen T, Mellstedt H, Jondal M, Presence of clonal T cell populations in chronic B lymphocytic leukemia and smoldering myeloma, *J Exp Med*, **171**: 659, 1990
- Westermann J, Ehlers E, Exton M, Kaiser M, Bode U, Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses, *Immunol Rev*, **184**: 20, 2001
- Wherry E, Teichgraber V, Becker T, Masopust D, Kaech S, Anita R, Von Andrian U, Ahmed R, Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets, *Nat Immunol*, **4**: 225, 2003
- Wiseman B, Werb Z, Stromal effects on mammary gland development and breast cancer, *Science*, **296**: 1046, 2002
- Wittke F, Hoffmann R, Buer J, Dallmann I, Oevermann K, Sel S, Wandert T, Ganzer A, Atzpodien J, Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma, *Br J Cancer*, **79**: 1182, 1999
- Wojtówicz-Praga S, Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy, *J Immunother*, **20**: 165, 1997
- Wright S, Kilinski G, Talib G, Lowe K, Burnside J, Wu J, Dolby N, Dombrowski K, Lebkowski J, Philip R, Cytotoxic T lymphocytes from humans with adenocarcinomas stimulated by native MUC-1 mucin and a peptide mutated at a glycosylation site, *J Immunother*, **23**: 2, 2000
- Wu C, Wang K, McDyer J, Seder R, Prostaglandin E₂ and Dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness, *J Immunol*, **161**: 2723, 1998

Wybran J, Hellstrom K, Funderberg H, Cytotoxicity of human rosette-forming blood lymphocytes on cultivated human tumor cells, *Int J Cancer*, **13**: 515, 1974

Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, Saito T, Toyoshima K, Similarity of protein encoded by the human c-erb-B2 gene to epidermal growth factor receptor, *Nature (Lond.)*, **319**: 230, 1986

Yee C, Riddell S, Greenberg P, In vivo tracking of tumor-specific T cells, *Curr Op Immunol*, **13**: 141, 2001

Yefenof E, Picker L, Sxheuermann R, Tucker T, Vitetta E, Uhr J, Cancer dormancy: isolation and characterization of dormant lymphoma cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 1829, 1993

Yip Y, Ward R, Anti-ErbB2 monoclonal antibodies and ErbB-2-directed vaccines, *Cancer Immunol Immunother*, **50**: 569, 2002

Yu P, Lee Y, Liu W, Chin R, Wang J, Wang Y, Schietinger A, Philip M, Schreiber H, Fu Y-X, Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors, *Nat Immunol*, **5**: 141, 2004

Yue F, Dummer R, Geertsens R, Hofbauer G, Laine E, Manolio S, Burg G, Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules, *Int J Cancer*, **71**: 630, 1997

Zeng J, Fournier P, Schirmacher V, Induction of interferon α and TRAIL in human blood mononuclear cells by HN but not F protein of Newcastle Disease Virus, *Virology*, **297**: 19, 2002

Zhang C, Ao Z, Seth A, Schlossman S, A mitochondrial membrane protein defined by a novel monoclonal antibody is preferentially detected in apoptotic cells, *J Immunol*, **157**: 3980, 1996

Zhang L, Conejo-Garcia J, Katsaros D, Gimotty P, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman M, Rubin S, Coukos G, Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer, *N Eng J Med*, **348**: 203, 2003

Zheng L, Ojcius D, Garaud F, Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK-cell dependent mechanism, *J Exp Med*, **184**: 579, 1996

Zinkernagel R, Bachmann M, Kundig T, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H, On immunological memory, *Annu Rev Immunol*, **14**: 333, 1996

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
AICD	activation induced cell death
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
B	Belgien
BD	Becton Dickinson
bFGF	basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CD	cluster of differentiation
CH	Schweiz
CM	Central Memory
COX	Cyclooxygenase
D	Deutschland
DCIS	ductal carcinoma in situ
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's modifiziertes eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dsRNA	doppelsträngige RNA
DZ	Dendritische Zell/en
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISpot	enzyme-linked immunosorbent spot
EM	Effector Memory (Effektor Gedächtnis)
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme-linked immunospot assay
F	Frankreich
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FasL	Fas-Ligand
FI	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FNA	fine-needle aspirates
g	Gramm
GM-CSF	granulocyte and monocyte colony stimulating factor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HEV	High Endothelial Venules
HNO	Hals-Nasen-Ohren
ICAM	intracellular adhesion molecule
ICOS	inducible costimulatory molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inc.	Incorporation
inkl.	inklusive
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
l	Liter
Lab.	Laboratories
LAK	lymphokine activated killer cells
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP	macrophage chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex
MGUS	monoclonal gammopathy of unknown significance

Min.	Minuten
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM	Multiples Myelom
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MNZ	mononukleäre Zellen
MW	molecular weight
N	Normal
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP ⁺ /NAPDH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDV	Newcastle Disease Virus
NK	Natürliche Killer
NL	Niederlande
Nm	Nanometer
NOD	Non-obese-diabetic
PAF	platelet activating factor
PB	peripheres Blut
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
PC	Phycocyanin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI	Propidiumjodid
PS	Phosphatidylserin
RCC	renal cell carcinoma
RNA	Ribonukleinsäure
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
Scid	severe combined immunodeficiency
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
sog.	sogenannte
SPI-6	Serin-Protease-Inhibitor 6
Std.	Stunden
T _{reg} -Zellen	regulatorische T-Zellen

TH	T-Helfer
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF	Transforming growth factor
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TM	Trademark
TT	Tetanus Toxoid
TZ	T-Zell/en
TZR	T-Zell-Rezeptor
u.a.	und andere
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
UpM	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
UV	ultraviolett
u.v.m.	und vieles mehr
v/v	volume per volume
v.a.	vor allem
VCAM	vascular cellular adhesion molecule
w/v	weight per volume
z.B.	zum Beispiel
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten

8.2 Präliminäre Ergebnisse

8.2.1 Etablierung eines NOD/Scid-Mausmodells für Myelomzell-Linien zur therapeutischen T-Zell-Testung *in vivo*

Erkenntnisse zum therapeutischen Potential MUC-1 spezifischer T-Zellen von Plasmazytom-Patienten bilden die Basis für die Entwicklung effizienter Therapiestrategien mit adoptiv transferierten Immunzellen. Als Xenotransplantations-Modell für die prä-klinische Immuntherapie humaner Tumore *in vivo* eignet sich das NOD/Scid-Mausmodell, (*Non-obese-Diabetes-Mellitus/severe combined immunodeficiency*). Aufgrund der schwerwiegenden Immundefizienz der Mäuse (Schultz 1995) erlaubt es u.a. die Transplantation von humanen Tumoren unter Bewahrung histo-morphologischer Charakteristika (Visonneau 1998, Dazzi 1998, Weissman 1999, Beckhove 2003) sowie eine prä-klinische Charakterisierung und Testung T-Zell-vermittelter Tumorabstoßungen *in vivo* und *in situ* (Helgason 2000). Das NOD/Scid-Mausmodell wurde bisher vor allem für die Xenotransplantation und Untersuchung solider humaner Tumore, wie Mammakarzinom, HNSCC, Glioblastom und Pankreaskarzinom herangezogen (Beckhove 2003, Feuerer 2001b). Beim Multiplen Myelom wurden differente Mausmodelle beschrieben (rezensiert von Kuehl und Bergsagel 2002), die alle die größtmögliche Imitation der hämatologischen Tumorerkrankung des Menschen im Tier zum Ziel hatten. Hier sollte stattdessen eine einfache und verlässliche Beobachtung und Verfolgung von Tumorwachstum und T-Zell-vermittelten Tumorabstoßungsreaktionen ermöglicht werden. Demnach wurde versucht, ein NOD/Scid-Mausmodell für MM zu etablieren, bei dem transferierte Tumorzellen der etablierten humanen Multiplen Myelomzelllinie U266 zu einem soliden, subkutanen Tumor an der Flanke des Tieres auswachsen. Generelle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Transplantation und nachfolgende zelluläre Immuntherapie von Myelomzellen sind das effiziente Auswachsen im Tier und die Immunogenität des Tumors. Beide Parameter wurden in Folgeexperimenten untersucht.

8.2.2 Expression von MHC Klasse I HLA-A2 auf der Myelom Zell-Linie U266

Die Erkennung des Tumors durch zytotoxische CD8 Effektor-T-Zellen setzt die Übereinstimmung mindestens eines MHC Klasse I Allels zwischen Tumor- und T-Zellen voraus. Auf der MM-Zelllinie U266 konnte eine Expression von MHC Klasse I HLA-A2 verifiziert werden (Abb. 34). Folglich können von ihnen präsentierte TAAs prinzipiell von HLA-A2 restringierten CD8 T-Zellen erkannt werden.

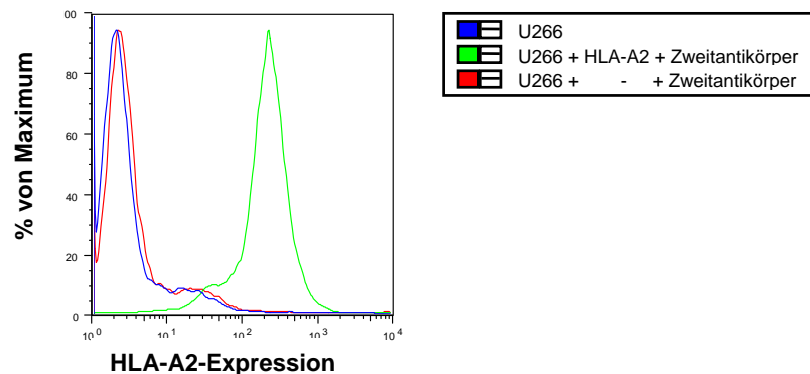


Abb. 34 Analyse der HLA-A2 Expression von U266 Myelomzellen. Dargestellt ist ein Histogramm mit den überlagerten Kurven ungefärbter, Zweitantikörper-gefärbter sowie HLA-A2 und Zweitantikörper-gefärbter U266-Zellen. Negativkontrolle waren ausschließlich mit Zweitantikörper gefärbte U266 Zellen.

8.2.3 Nachweis der MUC-1 Expression auf U266 Myelomzellen

Eine weitere wichtige Bedingung für die Immunogenität eines Tumors ist die Erkennung Tumor-assoziierten Antigens (TAA) durch spezifische T-Zellen. Die Untersuchung von MM-assoziiertem MUC-1 auf U266 Tumorzellen ergab, dass etwa 13% aller Zellen eine MUC-1 Expression aufweisen (Abb. 35).

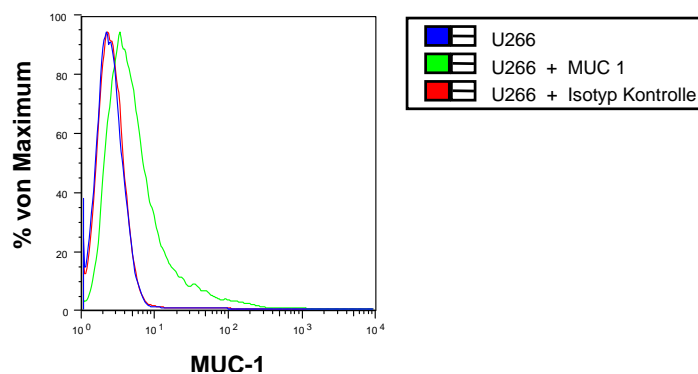


Abb. 35 Analyse der MUC-1 Expression von U266 Myelomzellen. Dargestellt ist ein Histogramm mit den überlagerten Kurven ungefärbter, MUC-1 und Isotyp-Kontrolle gefärbter U266 Zellen.

8.2.4 Transplantation von U266 Myelomzellen in NOD/Scid-Mäuse

Eine erfolgreiche Implantation von s.c. injizierten U266 Myelomzellen in NOD/Scid-Mäusen belegt die Tumorstadiumskurve in Abb. 36 A. Das Wachstum der subkutan applizierten Tumorzellen verlief lokal progredient mit Infiltration benachbarter Strukturen, wie Muskulatur und Dermis. Eine Tendenz zur systemischen Metastasierung konnte nicht detektiert werden. Daher überlebten die Tiere über einen längeren Zeitraum hinweg (bis zu 12 Wochen) die Bildung sehr großer Primärtumore. Die Tumoren erreichten 85 Tage nach Tumorzelltransfer eine durchschnittliche Größe von über 20 mm (Abb. 36 B).

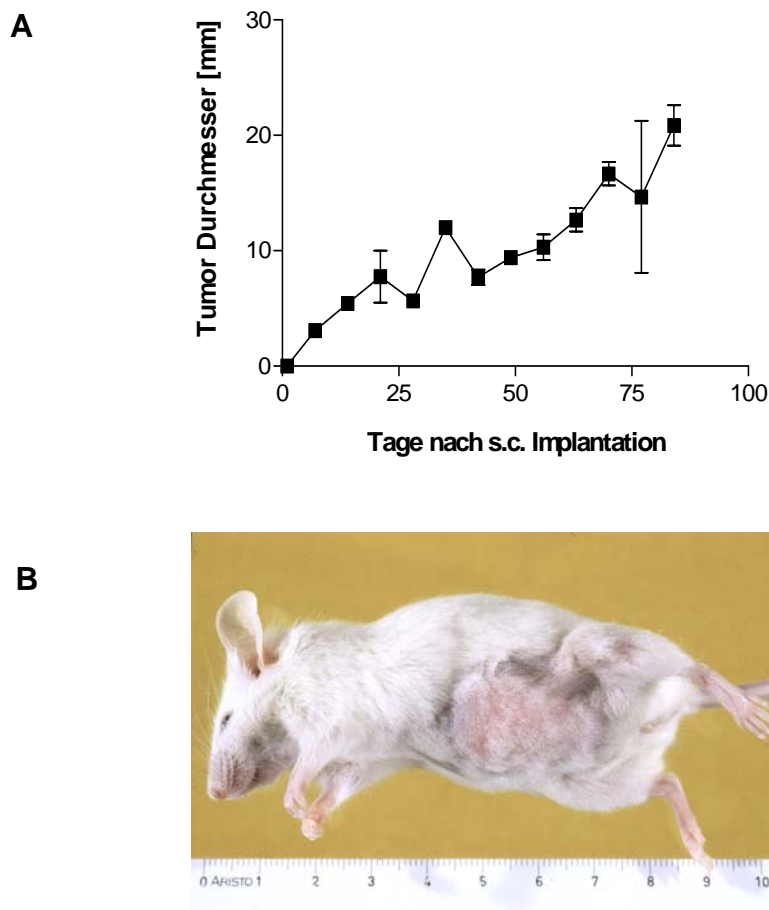


Abb. 36 Implantation von U266 Myelomzellen in NOD/Scid-Mäuse. **A**, Tumorstadiumskurve: gemittelter Tumordurchmesser (mm) gegen die Zeit nach Transfer von 5×10^6 Tumorzellen. **B**, NOD/Scid-Maus mit U266 Myelom-Tumor ca. 3 Monate nach Implantation.

8.2.5 Adoptive Immuntherapie von U266 tumortragenden NOD/Scid-Mäusen mit MUC-1 reaktivierten T-Zellen von MM-Patienten

In einem präliminären Experiment wurde das therapeutische Potential MUC-1 spezifischer T-Zellen von MM-Patienten in U266-Myelom tumortragenden NOD/Scid-Mäusen untersucht, die zuvor *in vitro* reaktiviert worden waren.

Aufgrund der geringen Mengen an isolierten T-Zellen wurden MUC-1- bzw. Insulin-Peptid restimulierte Blut- bzw. Knochenmark-T-Zellen nur in je eine tumortragende Maus i.p. transferiert, denen 6 Wochen zuvor präparierte Tumorstückchen aus U266 tumortragenden Mäusen s.c. implantiert wurden. Es wurden die Tumorprogredivenz in Form des Tumolvolumens einmal wöchentlich über einen Zeitraum von neun Wochen protokolliert.

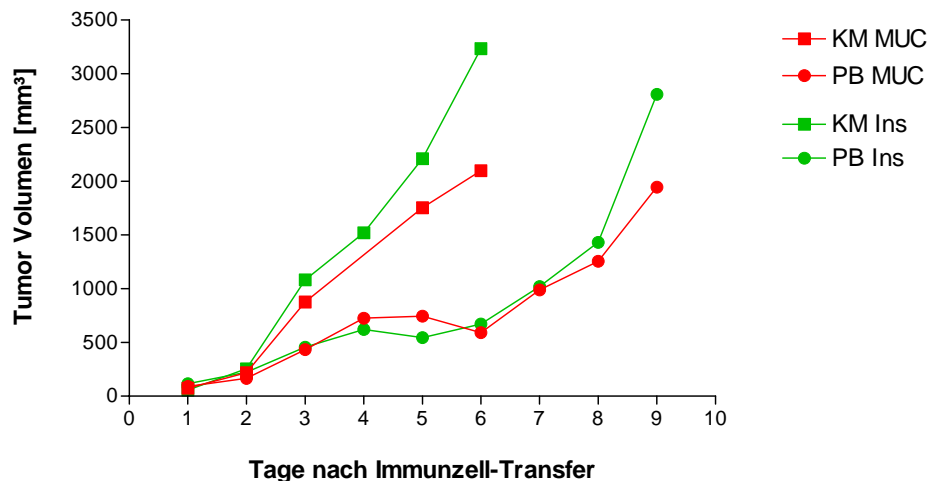


Abb 37 Adoptive Immuntherapie von U266-tumortragenden NOD/Scid-Mäusen. Dargestellt ist das Tumolvolumen [mm³] gegen die Zeit nach Immunzell-Transfer [Tagen] in einem Kurvendiagramm. Tumorstückchen aus U266-tumortragenden NOD/Scid-Mäusen wurden s.c. in 4 NOD/Scid-Mäuse implantiert. Nach 6 Wochen wurden 4×10^6 bzw. $4,75 \times 10^6$ T-Zellen (TZ) aus dem Knochenmark (KM) bzw. Blut (PB) eines Plasmozytom-Patienten pro Maus i.p. injiziert, die 2 Tage lang zuvor jeweils mit MUC-1 bzw. Insulin (Ins) Peptid-präsentierenden autologen Dendritischen Zellen (DZ) in einem Verhältnis von 20:1 (TZ:DZ) stimuliert worden waren.

Wie aus den Tumorwachstumskurven U266-tumortragender NOD/Scid-Mäuse ersichtlich ist, exhibieren die zwei mit reaktivierten Blut T-Zellen therapierten Tiere eine Verzögerung im Tumorwachstum verglichen mit jenen zwei Tieren, denen restimulierte Knochenmark T-Zellen injiziert wurden (Abb. 37). Bei den mit Blut T-Zellen behandelten Mäusen sieht man keinen Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Stimulation.

Insgesamt ließ sich in diesem *in vivo*-Experiment kein spezifischer Therapieeffekt der MUC-1 reaktivierten T-Zellen eines Patienten ermitteln. Bevor allgemeine Schlüsse gezogen werden können, müssen natürlich Zellen einer größeren Anzahl von Patienten in einer größeren Zahl von Tieren getestet werden.

8.2.6 Verlust der MUC-1 Expression in U266 tumortragenden NOD/Scid-Mäusen nach adoptiver Immuntherapie

Es wurde die Expression von MUC-1 im Tumorgewebe U266-tumortragender NOD/Scid-Mäuse nach Beendigung der adoptiven Immuntherapie mit MUC-1 reaktivierten Knochenmark T-Zellen bzw. ohne Therapie immunhistologisch untersucht. Eine MUC-1 Expression war weder im Tumorgewebe aus therapierten noch aus dem von untherapierten U266-tumortragenden NOD/Scid-Mäusen nachweisbar. Vorherige Untersuchungen hatten allerdings belegt, dass die native U266-Tumorlinie zu ca. 13% MUC-1 exprimiert. Folglich ist es nach der Tumorzell-Implantation zu einem Verlust der MUC-1 Expression gekommen. Ausgewachsene U266-Tumore regulieren demnach *in vivo* ihre MUC-1 Expression herunter.

8.2.7 Analyse von IL-15 Plasma-Konzentrationen beim Mammakarzinom

Im Zuge der systemischen Analyse ausgewählter Zytokine wurden auch IL-15 Plasmaspiegel aufgrund seiner bedeutenden Rolle bei der Generierung und Erhaltung von Gedächtnis T-Zellen untersucht (Schluns and Lefrançois 2003). Dabei wurde in allen 13 getesteten Mammakarzinom-Patienten eine, verglichen mit Referenzwerten für gesunde Spender aus der Literatur, die durchschnittlich bei 12,8 pg/ml [8,2 - 122 pg/ml] lagen, erniedrigte IL-15 Plasma-Konzentration detektiert (Tab. 13) (Lauw et al. 1999). Hierin könnte ein Grund für die häufig beschriebene Immunsuppression bei Tumorpatienten liegen.

Patienten Nr.	IL-15 [pg/ml]
	Plasma
754	0,59
793	0
794	0
801	1,28
808	3,06
821	0,4
851	0,4
855	0
887	0,64
900	0
902	2,52
909	2,47
914	0

Tab. 13 IL-15 Plasmawerte beim Mammakarzinom. Dargestellt sind die im ELISA-Test gemessenen IL-15 Konzentrationen [pg/ml] in Plasmaproben von Mammakarzinom-Patienten.

Beiträge zu wissenschaftlichen Publikationen

Zeitschriftenbeiträge

S Mürköster, M Weigand, C Choi, H Walczak V Schirmacher, V Umansky, Superantigen reactive V β 6⁺ T cells induce perforin/granzyme B mediated caspase-independent apoptosis in tumour cells, Br J Cancer, 86: 828, 2002

L Bai, P Beckhove, M Feuerer, V Umansky, C Choi, F Solomayer, I Diel, V Schirmacher, Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bi-directional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo, Int J Cancer, 103: 73, 2003

C Choi, M Witzens, M Bucur, M Feuerer, N Sommerfeldt, A Trojan, A Ho, V Schirmacher, H Goldschmidt, P Beckhove, Enrichment of functional CD8 memory T cells specific for MUC1 in bone marrow of multiple myeloma patients, Blood, in revision

P Beckhove, M Feuerer, M Dolenc, C Choi, N Sommerfeldt, J Schwendemann, K Ehlert, P Altevogt, F Schütz, G Bastert, V Schirmacher, V Umansky, Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognise and reject xenotransplanted autologous tumors, J Clin Invest, in revision

Schwendemann J, Choi C, Schirmacher V, Beckhove P, Dynamics of T-cell memory through activation induced cycles of proliferation and effector function according to chemokine receptor 7 expression, submitted

P Beckhove, H Schmitz-Winnenthal, C Volk, M Bucur, C Choi, J Weitz, M Buechler, V Schirmacher, K Z'graggen, Tumor reactive T cells in pancreatic cancer patients and mechanism for maintenance at high frequency, submitted

Abstracts (Auswahl)

P Beckhove, M Witzens, C Choi, AD Ho, H Goldschmidt, V Schirmacher, Enrichment of MUC 1-reactive memory T cells in bone marrow of multiple myeloma patients, Int J Cancer Res Treat, 25: 69 (Abstract), 2002

C Choi, F Schütz, J Foerster, HJ Strittmatter, G Bastert, V Schirmacher, P Beckhove, Cytokine profiling of bone marrow and peripheral blood memory T cells from primary breast cancer patients: Detection of TAA-reactive T cells in all tested patients; differences in TH-Polarisation between individual patients and immune cell compartments, Cancer Res Clin Oncol, 129 (Suppl.1): 26 (Abstract), 2003

Danksagung

Ich möchte mich besonders herzlich bei Herrn Prof. V. Schirmmacher für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die anregenden Diskussionen und seine guten Ideen bedanken.

Herrn Prof. B. Ludwig danke ich besonders für seine Bereitschaft, sich als Mentor dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen und sie zu begutachten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Philipp Beckhove für seine stetige Unterstützung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und seine guten Ideen. Sie haben einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Mariana Bucur für ihre stete Hilfsbereitschaft und für viele nützliche und wertvolle Ratschläge bedanken sowie für die Einführung in verschiedene Labortechniken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei allen meinen Arbeitskollegen für die gute Zusammenarbeit, ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Vielen Dank auch an Herrn K. Hexel, Herrn Barkowsky sowie Herrn M. Scheuermann für ihre Hilfe beim Sortieren von Zellen am FACSvantage – wenn nötig auch bis spät in die Nacht.

Ebenso danke ich Herrn Dr. A. Benner aus der Abteilung für Biostatistik, Deutsches Krebsforschungszentrum, für die Anfertigung der Statistik.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Ihre ständige liebevolle und verständnisvolle Unterstützung hat sehr zum Gelingen und Verfassen dieser Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Name Carmen Choi
Geburtsdatum 12.01.1976
Geburtsort Daejon/Südkorea

Schul Ausbildung

Feb. 1982 – Juli 1982 Besuch der 1. Klasse an der deutschen Auslandsschule
„Colegio de Goethe“, Asuncion, Paraguay
Aug. 1982 – Juli 1986 Grundschulausbildung an der Gruneliuschule in Frankfurt/Main
Aug. 1986 – Juli 1995 Besuch der Carl-Schurz-Schule, Gymnasium, Frankfurt/Main
Juli 1995 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am o.g. Gymnasium;
Note: 1,6

Studium

Sept. 1995 Immatrikulation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt/Main; Studiengang: Biochemie/Diplom
Okt. 1997 Ablegen der Diplom-Biochemiker-Vorprüfung, Note: 1
(Prof. Fasold, Prof. Rüterjans, Prof. Prinzinger)
1998 – 1999 zeitweilige Einstellung als studentische Hilfskraft im Zentrum
der Biologischen Chemie der Frankfurter Uniklinik,
Abteilung Prof. Chandra,
Assistentin bei dem jedes Semester stattfindenden
zweiwöchigen Biochemischen Praktikum für Zahnmediziner
Nov. 1999 Ablegen der Diplom-Biochemiker-Prüfung, Note: 1
(Prof. Fasold, Prof. Rüterjans, Prof. Pons)
Juni 2000 Fertigstellung der Diplomarbeit, Note: 1
seit Sept. 2000 Doktorarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum,
Heidelberg, Abteilung Zelluläre Immunologie,
Prof. Schirmmacher